

Antagonisierung von Stress-Signalwegen durch das Amyloid Precursor Protein (APP): Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der APP-vermittelten Neuroprotektion

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl. Biol. Steffi Chang

aus Meiningen

1. Referent: PD Dr. Donat Kögel

2. Referent: Prof. Dr. Paul G. Layer

3. Referent: Prof. Dr. Ralf A. W. Galuske

Tag der Einreichung: 18. August

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November

Darmstadt 2011

D 17

Die Ergebnisse der folgenden Arbeit wurden bereits teilweise in folgenden Publikationen veröffentlicht:

sAPP α antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress

E. Copanaki, S. Chang, A. Vlachos, J. Tschäpe, U. Müller, D. Kögel, T. Deller
Molecular and Cellular Neuroscience 44 (2010) 386–393

Liposome-incorporated DHA increases neuronal survival by enhancing non-amyloidogenic APP processing

G. Eckert*, S. Chang*, J. Eckmann, E. Copanaki, S. Hagl, U. Hener, W. Müller, D. Kögel
Biochimica et Biophysica Acta 1808 (2011) 236–243

*both authors contributed equally to this work.

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	DIE ALZHEIMER KRANKHEIT	1
1.2	DIE ENTSTEHUNG VON PLAQUES UND NEUROBRILLÄREN BÜNDELN	2
1.3	AMYLOID β KASKADE - EINE HYPOTHESE ZUR KRANKHEITSINITIATION	3
1.4	MECHANISMEN DER NEURODEGENERATION BEI MORBUS ALZHEIMER	5
1.5	RISIKOFAKTOREN IN DER PATHOLOGIE DER ALZHEIMER KRANKHEIT	9
1.6	DIE PROTEOLYTISCHE SPALTUNG VON APP	12
1.6.1	DIE NICHT-AMYLOIDOGENE PROZESSIERUNG VON APP	13
1.6.2	DIE AMYLOIDOGENE PROZESSIERUNG VON APP	15
1.7	DIE STRUKTUR UND PHYSIOLOGISCHE FUNKTION DES AMYLOID PRECURSOR PROTEINS	18
<u>2</u>	<u>ZIELSETZUNG</u>	<u>24</u>
<u>3</u>	<u>MATERIAL</u>	<u>26</u>
3.1	ZELLKULTURMATERIAL	26
3.2	CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL	27
3.3	GERÄTE UND SOFTWARE	30
<u>4</u>	<u>METHODEN</u>	<u>32</u>
4.1	ZELLBIOLOGISCHE ARBEITEN	32
4.1.1	KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN VON ZELLINIEN UND PRIMÄRZELLKULTUREN	32
4.1.2	ZELLINIEN	32
4.1.3	SUBKULTIVIERUNG	32
4.1.4	EINFRIEREN VON ZELLEN	33
4.1.5	AUFTAUEN VON ZELLEN	33
4.1.6	ZELLZAHLBESTIMMUNG	33
4.1.7	HERSTELLUNG VON KONDITIONIERTEM MEDIUM	34
4.1.8	PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG HIPPOCAMPALER NEURONEN	34
4.2	ZYTOTOXISCHE STRESS- UND APOPTOSE-STIMULI	36
4.3	NACHWEIS VON APOPTOSE	38
4.3.1	CASPASE-3 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG (CASPASE-ASSAY)	38
4.3.2	FÄRBUNG PROPIDIUMIODID UND HOECHST	40
4.3.3	TRYPANBLAU-FÄRBUNG	40
4.4	ANALYSE VON PROTEINEN	41
4.4.1	HERSTELLUNG VON GESAMTZELLEXTRAKTEN	41
4.4.2	PROTEINGEHALTSBESTIMMUNG VON GESAMTZELLEXTRAKTEN	42
4.4.3	DISKONTINUIERLICHE SDS-PAGE	42

4.4.4	WESTERN BLOT	44
4.4.5	IMMUNDETEKTION	44
4.4.6	ENTFERNEN VON ANTIKÖRPERN („STRIPPING“)	45
4.5	NUKLEINSÄUREARBEITSTECHNIKEN	46
4.5.1	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA	46
4.5.2	REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA (RT-PCR)	46
4.5.3	QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (QPCR)	47
4.6	ELISA	48
4.7	MTT	48
4.8	HERSTELLUNG VON LIPOSOMEN	49
4.9	ANISOTROPIE-MESSUNG VON HEK-APP ZELLEN	50
4.10	HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG VON 6xHis-SAPPα AUS <i>PICHIA PASTORIS</i>	50
4.11	DATENANALYSE	54
5	ERGEBNISSE	55
5.1	DIE ROLLE DES SPALTPRODUKTS SAPPα IN DER VERMITTLUNG VON NEUROPROTEKTION UNTER BEDINGUNGEN VON PROTEASOMALEM STRESS	55
5.1.1	CHARAKTERISIERUNG DER APP-ÜBEREXPRIMIERENDEN HEK-ZELLEN	55
5.1.2	KONDITIONIERTE ÜBERSTÄNDE VON HEK-APP ZELLEN SCHÜTZEN PC12 ZELLEN VOR DER DURCH PROTEASOMALEN STRESS INDUZIERTEN APOPTOSE	57
5.1.3	SAPP α , NICHT JEDOCH SAPP β SCHÜTZT DOSISABHÄNGIG VOR PROTEASOMALEM STRESS	60
5.1.4	SEKRETIERTES APP REDUZIERT DIE JNK-AKTIVIERUNG UNTER PROTEASOMALEM STRESS	62
5.1.5	DIE PROTEKTION DURCH SAPP WIRD DURCH DIE AKTIVIERUNG DES PI3K/AKT SIGNALWEGES VERMITTELT	63
5.2	DER EINFLUSS VON DOCOSAHEXAENSÄURE AUF DEN METABOLISMUS UND DIE ZYTOPROTEKTIVE FUNKTION VON APP	65
5.2.1	ETABLIERUNG DER DOSIS-WIRKUNGSBEZIEHUNG DER THAPSIGARGIN- UND STAUROSPORIN-INDUZIERTEN APOPTOSE IN HEK-APP ZELLEN	67
5.2.2	DIE LANGZEITBEHANDLUNG VON HEK-APP ZELLEN MIT DHA ERHÖHT DIE MEMBRANFLUIDITÄT UND DIE SEKRETION VON SAPP α	68
5.2.3	DIE LANGZEITBEHANDLUNG VON HEK-APP ZELLEN MIT DHA SCHÜTZT VOR DEM DURCH THAPSIGARGIN INDUZIERTEN ZELLTOD	72
5.2.4	SAPP α IST ESSENTIELL FÜR DEN ZYTOPROTEKTIVEN EFFEKT VON DHA	73
5.2.5	ETABLIERUNG DES THAPSIGARGIN-INDUZIERTEN SCHÄDIGUNGSMODELLS IN NEURONALEN PC12 ZELLEN	74
5.2.6	SEKRETIERTES APP SCHÜTZT PC12 ZELLEN VOR DER THAPSIGARGIN-INDUZIERTEN APOPTOSE	75
5.2.7	DIE PROTEKTION VOR DER THAPSIGARGIN-INDUZIERTEN APOPTOSE WIRD DURCH DIE MODULATION DES PI3K/AKT-SIGNALWEGES UND DES JNK-SIGNALWEGES VERMITTELT	76
5.2.8	NEUROPROTEKTION DURCH REKOMBINANTES, AUFGEREINIGTES SAPP α	78
5.2.9	6xHis-SAPP α SCHÜTZT HIPPOCAMPAL NEURONEN VOR DER NMDA-SCHÄDIGUNG	80
5.2.10	DIE KURZZEITBEHANDLUNG VON PC12 ZELLEN MIT HOHEN DOSEN AN DHA ERHÖHT DIE ZELL-VIABILITÄT UND SCHÜTZT VOR DEM ZELLTOD	82
5.2.11	KOMPLEXIERUNG VON DHA AN BSA - EINE ALTERNATIVE ZU TRANSFER-LIPOSOMEN	84
6	DISKUSSION	86

6.1	SAPPα WIRKT NEURONALEM ZELLTOD INDUZIERT DURCH PROTEASOMALEN STRESS ENTGEGEN	87
6.1.1	SAPP α -PRODUKTION IN HEK ZELLEN	87
6.1.2	SAPP α VERMITTELTE PROTEKTIVE FUNKTIONEN DES AMYLOID-PRECURSOR PROTEINS	88
6.1.3	SAPP α SCHÜTZT NEURONALE PC12 ZELLEN VOR STRESS DURCH MODULATION DES PRO-APOPTOTISCHEN JNK-SIGNALWEGES UND DES ANTI-APOPTOTISCHEN PI3K/AKT SIGNALWEGES	89
6.1.4	SAPP α SCHÜTZT NEURONALE ZELLEN VOR PROTEASOMALEM STRESS	96
6.2	DHA ERHÖHT NEURONALES ZELLÜBERLEBEN DURCH STEIGERUNG DES NICHT-AMYLOIDOGENEN APP-PROZESSIERUNGSWEGES	97
6.2.1	DHA WIRD IN DIE ZELLMEMBRAN INKORPORIERT UND STEIGERT DIE MEMBRANFLUIDITÄT	98
6.2.2	DHA BEEINFLUSST DIE PROZESSIERUNG VON APP	99
6.2.3	DHA SCHÜTZT VOR THAPSIGARGIN-INDUZIERTER APOPTOSE	100
<u>7</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>103</u>
<u>8</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>105</u>
<u>9</u>	<u>ANHANG</u>	<u>125</u>
9.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
9.2	TABELLENVERZEICHNIS	129
9.3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	130

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

1 EINLEITUNG

1.1 DIE ALZHEIMER KRANKHEIT

Der namensgebende Entdecker der Alzheimer Krankheit bzw. Alzheimer Demenz, Alois Alzheimer, beschrieb erstmals die klinischen und pathologischen Merkmale der Erkrankung innerhalb eines Vortrages bei der 37. Versammlung der Südwestdeutschen Irrenärzte im Jahre 1906. Er sprach von einer früh auftretenden Gedächtnisschwäche, die mit Desorientierung und Halluzinationen assoziiert schien. Dem klinischen Krankheitsbild wurden außerdem der Verlust der Sprachfähigkeit, eine allgemeine Verwirrtheit, ein eingeschränktes Urteilsvermögen und eine generelle Wesensveränderung zugeordnet. Zusammengefasst wurde dadurch der Begriff der Demenz geprägt. Nach dem Tod seiner 52-jährigen Patientin Auguste Deter obduzierte Alois Alzheimer den Leichnam und entdeckte histopathologische Veränderungen des Gehirns, die bis heute als charakteristische Merkmale der Alzheimer Erkrankung gelten. Am auffallendsten war wohl das stark atrophierte Gehirn mit eigentümlichen Eiweiß-Ablagerungen. Diese Ablagerungen sind heute als Amyloid-Plaques bekannt. Intrazellulär entdeckte er atypische fibrilläre Strukturen, die heute als neurofibrilläre Bündel bezeichnet werden.

Die Relevanz einer therapeutischen Intervention bei der Alzheimer Krankheit, auch Morbus Alzheimer genannt, ergibt sich aus der epidemiologischen Entwicklung. Zurzeit sind über 1,1 Millionen Menschen in Deutschland an einer Demenz erkrankt, wobei mehr als zwei Drittel von Morbus Alzheimer betroffen sind (Deutsche Alzheimer Gesellschaft). Die demographische Entwicklung Deutschlands zeigt eine alternde Gesellschaft, was in engem Zusammenhang mit der Zunahme an Alzheimer Erkrankungen steht, da der größte Risikofaktor das Altern an sich ist. Mathematischen Kalkulationen zufolge sind im Jahre 2050 in Deutschland 2,6 Millionen Demenz-Erkrankte zu erwarten. Das entspricht einem Anstieg von 35.000 Patienten pro Jahr, sofern kein Durchbruch in Prävention und Therapie gelingt.

1.2 DIE ENTSTEHUNG VON PLAQUES UND NEUROBRILLÄREN BÜNDELN

Die bei der Alzheimer Krankheit so typischen bis zu 200 µm großen extrazellulären Plaques werden als Akkumulation von Proteinen und Lipiden beschrieben, deren Hauptkomponente ein 4 kDa großes Peptid darstellt. Glenner und Wong identifizierten 1984 als erstes dieses Amyloid β Peptid (Aβ) aus Hirnhautblutgefäßen von Patienten mit dem Down Syndrom (Glenner and Wong, 1984a; Glenner and Wong, 1984b). Aβ entsteht durch sequenzielle proteolytische Spaltung von APP und tritt in variablen Größen von 39-42 Aminosäuren auf. Innerhalb der Plaques liegt Aβ in aggregierter Form vor, wobei die Akkumulation in der Kernregion der Plaques besonders dicht scheint (Abbildung 1-1).

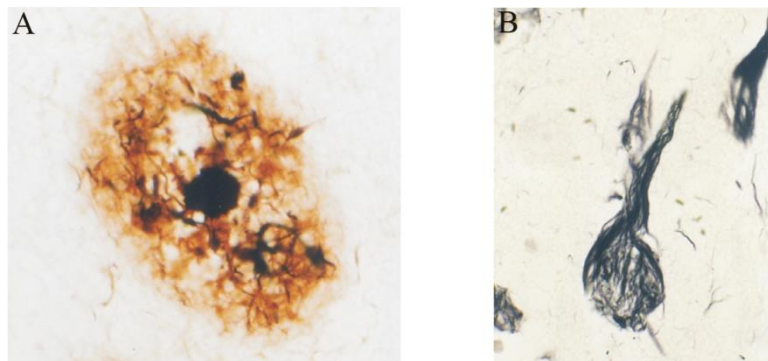


ABBILDUNG 1-1: Amyloid Plaques und neurofibrilläre Bündel. A) Extrazellulärer Plaque bestehend hauptsächlich aus Amyloid-β mit verstärkter Akkumulation im Kern der Ablagerung (Methamin Färbung). B) Intrazelluläre Zusammenlagerung von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zu neurofibrillären Bündeln (Gallyas-Silberfärbung) (Bogdanovic, 2000)

Ein zweites pathohistologisches Merkmal der Alzheimer Erkrankung ist die Ausbildung von neurofibrillären Bündeln (NFT, *neurofibrillary tangles*). Diese intrazellulären Agglomerate bestehen aus hyperphosphorylierten und hyperacetylierten Tau-Proteinen, die sich zu paarigen helikalen Filamenten (PHFs, *paired helical filaments*) zusammenlagern. Unter physiologischen Bedingungen sind Tau-Proteine mit Mikrotubuli assoziiert und üben so eine Funktion in intrazellulären Transportvorgängen aus (Drubin et al., 1986; Drubin and Kirschner, 1986). Unter pathologischen Bedingungen wird Tau hyperphosphoryliert und dissoziiert von den Mikrotubuli. Dies hat in Neuronen vor allem eine Beeinträchtigung des axonalen Transports zur Folge. Die Akkumulation von Tau und die Ausbildung von NFTs werden als wesentliche Pathomechanismen für den Verlust von Neuronen durch Neurodegeneration angesehen (Garcia and Cleveland, 2001). Demgemäß scheinen kognitive Defizite und das Ausmaß der Demenz-Erkrankung mit der Bildung der Fibrillen zu

korrelieren (Nagy et al., 1995). Hierbei stellten Braak und Braak einen chronischen Verlauf, unterteilt in verschiedene Stadien, zu Grunde (Braak and Braak, 1991).

1.3 AMYLOID β KASKADE - EINE HYPOTHESE ZUR KRANKHEITSINITIATION

Wie schon Alois Alzheimer beschrieb, existieren zwei prominente histopathologische Merkmale der Alzheimer Krankheit. Zum einen sind das Ablagerungen von aggregierten A β -Peptiden in diffusen (amorphen) oder neuritischen Plaques und zum anderen sind es intrazelluläre Ablagerungen von hyperphosphorylierten Tau-Proteinen zu paarigen helikalen Filamenten bis hin zu neurofibrillären Bündeln.

Es entwickelte sich die Frage, ob es einen kausalen Zusammenhang der beiden Befunde gibt oder ob beide unabhängig voneinander die Initiation der Alzheimer Krankheit bewirken. Eine der Hypothesen zur Krankheitsinitiation beschreibt die sogenannte Amyloid β Kaskade, in der A β -Aggregate als Initiationsfaktor für alle weiteren Ereignisse im Krankheitsverlauf, wie die Hyperphosphorylierung und Aggregation von Tau, verantwortlich gemacht werden. Obwohl noch offen ist wie genau A β 42 diese Kaskade auslöst, gibt es einige Studien, die unterstützende Hinweise lieferten. So konnten Cummings und Kollegen die Größe der von A β -Plaques betroffenen kortikalen Fläche in Korrelation mit dem Ausmaß der Störung der kognitiven Fähigkeiten setzen (Cummings and Cotman, 1995). Darüber hinaus wird sie durch den Befund gestützt, dass verschiedene Mutationen in *APP*, *PSEN1* (*Presenilin-1*) oder *PSEN2* (*Presenilin-2*), die die familiäre Form der Alzheimer Demenz (FAD) auslösen können, eine Erhöhung der Produktion von A β 42 nach sich ziehen, d.h. dass ein gemeinsamer Effekt auf die Prozessierung von APP in Richtung des amyloidogenen Prozessierungsweges eintritt (vgl. 1.6.). Experimentell konnte in Fibroblasten von FAD-Patienten, sowie in Tiermodellen mit entsprechenden Gen-Mutationen, erhöhte A β 42-Spiegel nachgewiesen werden (Citron et al., 1994; Suzuki et al., 1994). Des Weiteren konnte die Duplikation des *APP* Gens mit einer erhöhten intrazellulären A β 42-Bildung assoziiert werden (Cabrejo et al., 2006; Rovelet-Lecrux et al., 2006). Neben dieser erhöhten Produktion an A β 42, gibt es ferner Hinweise auf eine Dysfunktion in der Beseitigung von A β aus der Zelle, die eine Akkumulation zusätzlich begünstigen (Lambert and Amouyel, 2011). A β -Akkumulationen konnten bisher intrazellulär (D'Andrea et al., 2001; Gouras et al., 2000; Nagele et al., 2002; Wertkin et al., 1993) und extrazellulär bei Morbus Alzheimer nachgewiesen werden. Der größte Teil wird dabei in den Extrazellulärraum sezerniert, wo er in aggregierter Form in den Amyloid-Plaques zu finden ist. Intrazellulär ist A β in vielen

subzellulären Kompartimenten wie ER, Golgi / Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und Endosomen lokalisiert (LaFerla et al., 2007). Welcher A β -Aggregierungszustand für die Neurotoxizität verantwortlich ist, wird momentan noch kontrovers diskutiert. Derzeit wird A β -Monomeren im Gegensatz zu den Oligomeren und Protofibrillen, denen eine neurotoxische Wirkung innerhalb der Langzeitpotenzierung und synaptischer Plastizität zugeschrieben wird, kein derartiger Effekt beigemessen (Walsh et al., 2002a; Walsh et al., 2002b).

Dafür spricht, dass die Oligomerisierung von A β toxische Effekte bewirkt, die in einer progressiven synaptischen und neuritischen Schädigung resultieren. Eine Kolo-kalisation von A β -Aggregaten und dystrophen Neuronen unterstützen die Hypothese. Die FAD-assoziierte A β 42-Isoform weist eine erhöhte Aggregationstendenz auf (Hardy and Selkoe, 2002), wodurch eine höhere Neurotoxizität hervorgerufen wird (Yankner, 1996). Darüber hinaus ist für A β 42 eine höhere Degradations-Resistenz als für A β 40 bekannt (Glabbe, 2001), wodurch die Ablagerungen im Gehirn vermehrt werden (Iwatsubo et al., 1994; Selkoe, 1999). Diese Befunde belegen A β 42 als die toxischere Form. Untersuchungen an Trisomie 21 Patienten unterstützen die Annahme, dass eine erhöhte Genexpression von *APP* und dadurch bedingt gesteigerte APP mRNA-Level, die in einer erhöhten A β -Produktion resultieren (Rovelet-Lecrux et al., 2006), in direktem Zusammenhang mit der Ausprägung der Krankheit steht. Down-Syndrom Patienten entwickeln ab dem 40. Lebensjahr die neuropathologischen Charakteristika von Morbus Alzheimer (Lemere et al., 1996; Querfurth et al., 1995).

Integriert in die Hypothese der Amyloid β Kaskade, belegen Studien eine indirekte Interaktion zwischen Amyloid β und Tau, da die Hyperphosphorylierung und Aggregation von Tau durch A β -Aggregation verstärkt werden kann (De Felice et al., 2008; Gotz et al., 2001). Unter physiologischen Bedingungen reguliert Tau den Aufbau und die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Mikrotubuli. Unter pathophysiologischen Umständen wird Tau hyperphosphoryliert und konnte in aggregierter Form, den neurofibrillären Bündeln, detektiert werden. Die Hyperphosphorylierung resultiert aus einer Störung der intrazellulären Signaltransduktion, hauptsächlich durch ein Ungleichgewicht der Aktivität verschiedener Proteinkinasen und Phosphatasen. Bei Morbus Alzheimer scheint A β für diesen Prozess verantwortlich zu sein und somit indirekt die Entstehung von neurofibrillären Bündeln zu begünstigen.

1.4 MECHANISMEN DER NEURODEGENERATION BEI MORBUS ALZHEIMER

Pathologisch ist das Gehirn eines Alzheimer Patienten, durch eine enorme Atrophie und einem hohen Verlust an Neuronen und Synapsen (Callahan et al., 1999; Terry et al., 1981) gekennzeichnet. Diese Aspekte sind auf spezielle Hirnareale, welche unter anderem für Lernen und Gedächtnis verantwortlich sind, begrenzt. Hierzu gehören Temporallappen mit dem Hippocampus, der Parietal-Lappen, der frontale Cortex und der Gyrus cinguli. Hierbei stellt sich die Frage nach den potentiellen Zelltodmechanismen, die der Neurodegeneration, die zunächst die Schädigung der Synapsen und zu späterem Zeitpunkt den Verlust von Neuronen verursacht, zu Grunde liegt. Mehrere Hinweise deuten auf den Beginn des Prozesses der Neurodegeneration in den Synapsen hin. Hierfür spricht, dass APP axonal transportiert wird, in den Präsynapsen akkumuliert und bei Erkrankung an Morbus Alzheimer entsprechend hohe Mengen an A β , in den Synapsen lokalisiert, nachgewiesen werden konnten (Buxbaum et al., 1998b; Lazarov et al., 2002). Zusätzlich ist bekannt, dass A β den axonalen Transport von APP beeinträchtigen kann, was die intrazelluläre Akkumulation von A β und die Dysfunktion des neuronalen Netzwerkes begünstigen könnte (Pigino et al., 2009; Pigino et al., 2003). Dies würde die Grundlage für eine mögliche Hypothese zur Ausbreitung des neurodegenerativen Prozesses bei Morbus Alzheimer bieten.

Für Morbus Alzheimer und andere neurodegenerative Erkrankungen wird kontrovers diskutiert, ob der Verlust von Neuronen auf einen primär apoptotischen oder einen nekrotischen Zelltod zurückzuführen ist (Behl, 2000; Gorman, 2008; Jellinger and Stadelmann, 2001). Ursprünglich ging man davon aus, dass nur Apoptose und Nekrose als potentielle Formen des Zelltodes im Rahmen der Neurodegeneration möglich wären. Mittlerweile gibt es jedoch Hinweise auf eine Beteiligung eines weiteren Mechanismus, des autophagischen Zelltodes (Jaeger et al., 2010; Jaeger and Wyss-Coray, 2010).

Die Apoptose bezeichnet einen distinkten, aktiven Vorgang, der zum kontrollierten Zelltod führt. Dieser Prozess spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Zellteilung und Zelltod. Beschrieben wurde er 1972 das erste Mal von Kerr und Kollegen (Kerr et al., 1972). Experimentell ließ sich nachweisen, dass A β über die Aktivierung der Caspasen 2, 3, 8 und 9 Apoptose in Neuronen induzieren kann (Loo et al., 1993). In *post mortem* Gehirngewebe von Alzheimer Patienten konnten verschiedene Nachweise für einen apoptotischen Zelltod erbracht werden. Hierzu zählen in situ Nachweise von DNA-Fragmenten (Lassmann et al., 1995; Su et al., 1994) und apoptotischen Körperchen (Cotman and Anderson, 1995). Darüber hinaus konnten DNA-

Fragmentierungen mit c-Jun, welches für die neuronale Apoptose essentiell ist (Estus et al., 1994), kolokalisiert vorgefunden werden (Anderson et al., 1995; Selznick et al., 1999).

Der Verlust des episodischen Gedächtnisses, welches eines der frühesten klinischen Anzeichen der Alzheimer Krankheit ist, wird eher der Schädigung synaptischer Funktionen als neuronalem Zelltod im Hippocampus zugeschrieben (Arendt, 2009; Morrison and Hof, 1997). Dendritische Dornfortsätze (Spines) scheinen als erstes synaptisches Element während der frühen kognitiven Beeinträchtigung betroffen zu sein (Bourne and Harris, 2008; Scheff et al., 2007). Eine erst kürzlich erschienene Studie von D'Amelio und Kollegen legt die Verbindung von frühen kognitiven Beeinträchtigungen bei der Alzheimer Krankheit mit einer nicht-apoptotischen Funktion der Caspase-3 nahe (D'Amelio et al., 2011). Die lokal begrenzte Caspase-3-Aktivierung in dendritischen Spines der CA1 Region des Hippocampus konnte für die funktionellen und strukturellen synaptischen Veränderungen, die mit der Beeinträchtigung des Gedächtnisses korrelierten, in einem Alzheimer Mausmodell nachgewiesen werden. Die Caspase-3-vermittelte Aktivierung von Calcineurin führte zu Veränderungen der glutamatergen synaptischen Transmission und Plastizität, und korrelierte mit der Degeneration der Spines und den Defiziten in Hippocampus-abhängigen Gedächtnisleistungen. Es gelang darüber hinaus durch eine pharmakologische Inhibition der Caspase-3-Aktivität die Spine-Dichte, die glutamaterge synaptische Transmission und partiell die Gedächtnisleistungen wieder herzustellen. Die Aktivität der Caspase-3 scheint somit unabhängig von ihrer apoptotischen Funktion kritisch für die frühe synaptische Dysfunktion in der Alzheimer-Pathologie im AD-Mausmodell zu sein.

Ein zentraler Stress-Signalweg, der durch vielfältige Formen von neurotoxischen Stress aktiviert wird, ist der sogenannte JNK/c-Jun Signalweg. Für diesen Signalweg wurde eine Funktion bei Prozessen der neuronalen Plastizität, Regeneration und beim Zelltod in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen beschrieben (Herdegen et al., 1997). Eine Aktivierung ist über diverse Stimuli, wie durch oxidativen oder genotoxischen Stress, Hitzeschock und proinflammatorische Cytokine, möglich (Cano and Mahadevan, 1995; Dai et al., 1995; Sluss et al., 1994; Westwick et al., 1994). Derzeit sind drei verschiedene Kinasen, die zur JNK-Untergruppe innerhalb der Familie der MAP Kinasen gehören, bekannt (JNK1, 2 & 3). Alle drei Familienmitglieder sind an apoptotischen Prozessen beteiligt sind (Davis, 1994; Johnson and Nakamura, 2007). Hierbei zeigte sich, dass JNK an der Initiation der Apoptose über den extrinsischen Signalweg, der durch die Bindung der Liganden (z.B. $\text{TNF}\alpha$, TRAIL, FAS-L, FAS2) an sogenannte Todesrezeptoren bedingt wird, und über den mitochondrialen Signalweg beteiligt ist (Elmore, 2007). Die Aktivierung von JNK erfolgt über eine duale Phosphorylierung an Thr183 und Tyr185 durch MAPK-Kinasen (MAPKK) (Moriguchi et al., 1997). Nach erfolgter Aktivierung transloziert JNK in den Nukleus und reguliert dort durch

Phosphorylierung verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Jun, ATF2, ELK-1 und p53 (Davis, 2000; Fuchs et al., 1998; Gupta et al., 1995; Zinck et al., 1995).

Im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer konnten Veränderungen im JNK-Signalweg festgestellt werden (Bogoyevitch et al., 2004). So konnte eine erhöhte JNK-Aktivierung in degenerierten Neuronen in *post mortem* Gehirnschnitten von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden (Shoji et al., 2000; Zhu et al., 2001). Außerdem resultiert die Aktivierung des JNK-Signalweges über A β in der Phosphorylierung von APP und beeinflusst wiederum die Produktion von A β (Colombo et al., 2009; Colombo et al., 2007). Im Gegenzug zeigten Braithwaite und Kollegen, dass die Inhibition des JNK-Signalweges in einem Alzheimer Modell zur Protektion vor einem A β -induzierten Zelltod führt (Braithwaite et al., 2010). Darüber hinaus konnte Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass eine APP-Überexpression *in vitro* zu einer verringerten JNK-Aktivität führt (Kögel et al., 2005). Diskutiert wird eine Interaktion von APP und dem JNK-Signalweg über JIP1 (*JNK interacting protein 1*), welches mit dem YENPTY-Motiv der intrazellulären Domäne von APP (AICD) interagieren kann (Scheinfeld et al., 2002). Zusammengefasst kann für APP eine wichtige Rolle in der Regulation des JNK-Signalweges unter zytotoxischem Stress postuliert werden.

In den folgenden Abschnitten sollen pathophysiologisch relevante Stressbedingungen, die zum Untergang von Neuronen bei Morbus Alzheimer beitragen könnten, näher erläutert werden. Dazu gehört zum einen die Störung der Kalziumhomöostase. Es ist bekannt, dass Mutationen, die die familiäre Alzheimer Demenz verursachen, eine Dysregulation der neuronalen Kalziumhomöostase nach sich ziehen und dadurch zur Pathologie der Erkrankung beitragen (Mattson, 2010). Die Veränderung der Ca²⁺-Spiegel treten bereits vor der Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten und dem neurodegenerativen Prozess im Gehirn von Alzheimer Patienten auf (Bezprozvanny and Mattson, 2008). Insbesondere verursacht eine Störung des Kalziumhaushaltes des endoplasmatischen Retikulums (ER) im AD-Mausmodell einen übermäßigen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, was Signalkaskaden auslösen kann, die die Funktionalität und Integrität von Neuronen beeinträchtigt. Studien belegen, dass eine Störung der neuronalen Kalziumhomöostase eine gemeinsame Rolle für die Alterserscheinungen des Gehirns und der Pathophysiologie in der Alzheimer Demenz spielt (Camandola and Mattson, 2010; Gleichmann et al., 2010; Khachaturian, 1989). So kann ein altersabhängiger Anstieg an oxidativem Stress ebenso wie Alzheimer-bedingte A β -Toxizität in einem gesteigerten intrazellulären Ca²⁺-Spiegel resultieren (Bezprozvanny and Mattson, 2008), welches wiederum bei Morbus Alzheimer zu einer gesteigerten amyloidogenen Prozessierung von APP führt (Liang et al., 2010). In

diesem Zusammenhang konnte in transgenen AD-Mausmodellen ein erhöhter oxidativer Stress in Neuronen mit den frühesten erkennbaren Stadien der A β - bzw. Tau-Pathologien assoziiert werden (Abdul et al., 2008). Zwei Hauptmechanismen beschreiben die toxische Wirkung von A β unter Einbeziehung der Störung der Ca²⁺-Homöostase. Im ersten beschriebenen Mechanismus aggregiert A β an der Zelloberfläche und begünstigt die erhöhte Generierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS; *reactive oxygen species*), was u.a. in der Peroxidation von Membranlipiden resultiert. Dies wiederum führt zur Produktion des Aldehyds 4-Hydroxynonenal, welches die Funktion von ATPasen und Glucose- und Glutamat-Transportern beeinträchtigt, was in einer Membrandepolarisation, einem Ca²⁺-Einstrom und einer zellulären Energie-Depletion resultiert (Blanc et al., 1998; Keller et al., 1997; Mark et al., 1995; Mark et al., 1997a; Mark et al., 1997b). Der zweite Mechanismus der A β -induzierten Störung der Kalziumhomöostase basiert auf der Bildung von Ca²⁺-permeablen Poren in der Plasmamembran durch A β -Oligomere (Zhu et al., 2000). Der lokale Kalziumeinstrom führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus angrenzenden Mitochondrien. Cytochrom C gelangt durch Diffusion an die Inositoltriphosphat-Rezeptoren (IP₃-R) des endoplasmatischen Retikulums, wo es binden kann und seinerseits die Kalziumausschüttung aus dem ER induziert. Die dadurch global erhöhte zytoplasmatische Kalziumkonzentration resultiert in einer erhöhten Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien, die mit einer weiteren globalen Ausschüttung von Cytochrom C reagieren. Diese simultane Freisetzung bewirkt die Formierung des Apoptosoms, in welchem u.a. Caspasen aktiviert werden und finalisiert letztendlich im apoptotischen Zelltod (Mattson and Chan, 2003). Zusammengenommen kann postuliert werden, dass die Destabilisierung der Kalziumhomöostase eine große Bedeutung in der Pathologie der Alzheimer Krankheit inne hat.

Die Akkumulation von A β und Tau im Alzheimer Gehirn ermöglicht die Zuordnung der Krankheit zu den Proteopathien und lässt vermuten, dass eine Dysregulation der Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle (PQC, *protein quality control*) direkt oder indirekt an der Pathogenese beteiligt ist. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) stellt einen zentralen Prozess in der Proteinqualitätskontrolle dar und wird in Zusammenhang mit der Alzheimer-Pathogenese gebracht. Nachweise von Ubiquitin-Akkumulationen in den Amyloid-Plaques und den neurofibrillären Bündeln geben hierfür Hinweise (li et al., 1997; Morishima-Kawashima et al., 1993; Perry et al., 1987). Darüber hinaus konnte eine mutierte Form von Ubiquitin-B (UBB+1), das die Ubiquitin-abhängige Proteolyse in neuronalen Zellen blockiert, nachgewiesen werden (Lindsten et al., 2002). UBB+1 wird als Mediator der A β -induzierten Neurotoxizität betrachtet (Song et al., 2003). Das Gehirn von Alzheimer Patienten ist auch durch die Akkumulation von oxidierten Proteinen (Forero et al., 2006; Zhu et al., 2007)

gekennzeichnet, die die Aktivität des UPS beeinträchtigen (Bence et al., 2001). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass ein Enzym des UPS, UCH-L1, geringer exprimiert wird und dadurch Funktion des UPS beeinträchtigt wird (Castegna et al., 2002; Pasinetti, 2001). Des Weiteren konnte eine Änderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten des UPS belegt werden (Mishto et al., 2006). Mehrere Studien geben Hinweise darauf, dass der Signalweg des Proteasoms eine Verbindung zwischen A β -Akkumulation und der Tau-Pathologie darstellt (Oddo, 2008; Oddo et al., 2004). Zusammengenommen kann proteasomaler Stress, der eine Beeinträchtigung des UPS nach sich zieht, als Faktor, der zur Pathologie von Morbus Alzheimer beiträgt, postuliert werden.

1.5 RISIKOFAKTOREN IN DER PATHOLOGIE DER ALZHEIMER KRANKHEIT

Die Alzheimer Krankheit ist eine der verbreitetsten neurodegenerativen Erkrankungen unserer westlichen Welt. Es ist davon auszugehen, dass 10% aller über 65 Jährigen und bis zu 50% aller über 85 Jährigen von dieser Alters-assozierten Krankheit betroffen sind. Der größte Risikofaktor ist dem zu Folge das Altern an sich (Gao et al., 1998; Jorm and Jolley, 1998). Diese progrediente Erkrankung entwickelt die ersten Symptome im fortgeschrittenen Lebensalter. Da Frauen, laut Statistik, eine höhere Lebenserwartung haben, stellen sie die Bevölkerungsgruppe dar, die häufiger betroffen ist. Diese Alters-assozierte Form der Alzheimer Krankheit wird oft auch als die sporadische Form bezeichnet. Obwohl das Altern anerkannterweise den größten Risikofaktor an Morbus Alzheimer zu erkranken darstellt, sind die molekularen Mechanismen in diesem Zusammenhang noch unklar. Bekannt ist, dass der Alterungsprozess eine prinzipiell nicht-pathogene Atrophie des Gehirns nach sich zieht und neuronale Zellmembranen eine veränderte Zusammensetzung aufweisen (Dyall et al., 2007; Uauy and Dangour, 2006). Ungesättigte Fettsäuren stellen einen wichtigen regulativen Bestandteil in den Zellmembranen dar, wobei die Docosahexaensäure (DHA) mit ca. 8% des Trockengewichts des Gehirnes die prominenteste ungesättigte Fettsäure darstellt (Muskiet et al., 2006). Der Einbau von ungesättigten Fettsäuren ist für die Modulation der Membranfluidität essentiell (Glomset, 2006; Marszalek and Lodish, 2005). Für den Alterungsprozess und die Alzheimer Krankheit stellt die Abnahme an mehrfach ungesättigten Fettsäuren und somit auch eine verringerte Membranfluidität von neuronalen Zellen einen gemeinsamen Faktor dar (Dyall et al., 2007; Uauy and Dangour, 2006).

Nur ein kleiner Anteil (ca. 5-10%) der Erkrankungen geht auf eine autosomal dominant vererbte Mutation zurück, die meist einen Ausbruch zwischen der 4. und 6. Lebensdekade

verursacht. Der größte Teil dieser familiären Alzheimer Erkrankung (FAD, *familial Alzheimer's Disease*) geht auf Mutationen in den Genen kodierend für das Amyloid-Precursor Protein oder den Präsenilinen zurück (Abbildung 1-2) (Mattson, 2004; Selkoe, 2001a). Diese genetische Prädisposition geht mit einer 100%igen Penetranz einher.

Histopathologische Analysen zeigten bei Patienten mit Trisomie 21 ähnliche Befunde wie bei Alzheimer-Patienten. Dies betraf die neuritischen Plaques mit der Hauptkomponente A β , welches aus der proteolytischen Spaltung des Vorläuferproteins APP hervorgeht. Da das APP Gen auf dem Chromosom 21 lokalisiert ist (Tanzi et al., 1987), zeigen Trisomie 21 Patienten eine gesteigerte Expression von APP, welche unwillkürlich eine erhöhte Bildung an A β -Peptiden nach sich zieht. Die im Zusammenhang mit den ab der 4. Lebensdekade auftretenden klinischen Symptomen der Alzheimer Krankheit führte zur Diagnose der EO AD (*early onset of Alzheimer's Disease*). Studien basierend auf einer Duplikation von APP untermauerten den Zusammenhang zwischen einer erhöhten APP-Expression und dem Auftreten von Morbus Alzheimer (Rovelet-Lecrux et al., 2006; Sleegers et al., 2006).

Risikofaktoren				
Gen	Chromosom	Genveränderungen	Ausbruch der Krankheit	Kategorie
APP	21	Trisomie 21	>40	EO AD
APP	21q21	39 (davon 7 nicht pathogen bzw. unklar)	45-55	EO FAD
PSEN1	14q24.2	194 (davon 12 nicht pathogen bzw. unklar)	25-65	EO FAD
PSEN2	1q42.13	23 (davon 9 nicht pathogen bzw. unklar)	45-88	EO FAD
Apo E	19q13.32	Polymorphismus ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4	>60	LO AD

ABBILDUNG 1-2: Genetische Risikofaktoren der Alzheimer Krankheit. Mutationen die zum frühen Ausbruch von AD (EO FAD, *early onset of familial Alzheimer's Disease*) führen zeigen sich auf den Chromosomen 21, 14 und 1, mit APP und PSEN1/2 als betroffene Gene. Alle Mutationen werden dominant vererbt und zeigen einen erhöhten Effekt auf den A β 42-Spiegel. Einzig Polymorphismen des ApoE Gens stellen einen Risikofaktor für einen späteren Ausbruch der Krankheit (LO AD, *late onset of Alzheimer's Disease*) dar. (Bekris et al., 2010; Cruts and Van Broeckhoven, 1998a; Cruts and Van Broeckhoven, 1998b; Theuns et al., 2006 und <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>)

Genetische Analysen von ca. 85 verschiedenen Familien ergaben bisher 32 Mutationen des *APP*-Gens, die nachweislich mit Morbus Alzheimer assoziiert sind (Goate et al., 1991; Hendriks et al., 1992; Levy et al., 1990; Mullan et al., 1992; Rovelet-Lecrux et al., 2006; Sleegers et al., 2006; Wakutani et al., 2004). Sie stellen ca. 15% der Mutationen, die zu einer frühen Ausprägung der Erkrankung führen. Einige dieser Mutationen haben Anwendung im Tiermodell gefunden. So zum Beispiel die "Schwedische" - Mutation oder die „London“ - Mutation (Lanz et al., 2003; Perez-Cruz et al., 2011; Stein et al., 2004; Tanghe et al., 2010). Die entwickelten transgenen Mausmodelle zeigen eine erhöhte A β Produktion und entwickeln einen Alzheimer-typischen Phänotyp mit unterschiedlichen neurologischen Abnormalitäten (Goate et al., 1991; Mullan et al., 1992). Diese Tiermodelle stellen eine entscheidende Möglichkeit zur Untersuchung der Alzheimer Krankheit dar. Neben den hier aufgeführten *APP*-Mutationen ist bekannt, dass eine anhaltende Aktivierung von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren dazu führen kann, dass das *APP*-Expressionsmuster verändert vorliegt. Die neuronale Spleißvariante *APP695* lag in den Neuronen weniger prominent vor. Diese Beobachtungen gingen mit einer erhöhten A β -Produktion einher, was darauf schließen lässt, dass die Modulation des Spleißprozesses ein weiterer Faktor ist, der zur Alzheimer-Pathologie im Sinne der Amyloid β Kaskade beitragen kann (Bordji et al., 2010). Mutationen des *PSEN1* Gens können nicht nur zu den schwersten Formen der Erkrankung, sondern auch zu einem Ausbruch in einem sehr frühen Lebensalter führen. Hier ist die Variabilität aber auch am größten (zusammengefasst in Bekris et al., 2010). *PSEN1*-assoziierter Morbus Alzheimer ist durch einen progredienten Krankheitsverlauf mit Parkinsonismus, einem veränderten Notch-Signaling und AICD- (*APP intracellular C-terminal domain*) Akkumulation charakterisiert (Goedert and Spillantini, 2006; Wolfe, 2007). Des Weiteren ist hier ein weites Spektrum an unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen bekannt, die teilweise mit bestimmten *PSEN1*-Mutationen korreliert werden können. Insgesamt stellen *PSEN1*-Mutationen 18% - 50% der autosomal dominant vererbten Formen dar (Theuns et al., 2000).

PSEN2-assoziierter Morbus Alzheimer unterscheidet sich von *PSEN1*-assoziertem durch den späteren Zeitpunkt des Ausbruchs der Erkrankung. Wobei der Zeitpunkt des Ausbruchs innerhalb einer Familie mit *PSEN2*-induzierter AD, sehr variabel sein kann, währenddessen der Zeitpunkt bei einer *PSEN1*-Mutation innerhalb einer Familie recht ähnlich ist. Ebenso wie Mutationen in den Genen *APP* oder *PSEN1*, zieht eine Mutation von *PSEN2* eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen A β 40 und A β 42 zu Gunsten der toxischeren 42 Aminosäuren großen Variante nach sich (Citron et al., 1992; Citron et al., 1997; Scheuner et al., 1996). ApoE (*Apolipoprotein E*) nimmt in diesem Zusammenhang eine Sonderstellung ein, da es Hinweise auf eine Assoziation mit der familiären Alzheimer Krankheit gekoppelt

mit einem späten Krankheitsausbruch und der sporadischen Form gibt. ApoE ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert und in 3 verschiedenen Allelen ausgeprägt: E2, E3, und E4. Alle drei Allele unterscheiden sich nur durch eine Aminosäure an Position 112 bzw. 158. E2 scheint das Risiko Alzheimer zu entwickeln zu minimieren (Corder et al., 1994), während E4 bekannt dafür ist mit einem erhöhten A β -Metabolismus zu korrelieren (Saunders et al., 1993). Dementsprechend erhöht ist das Risiko, wenn zwei Kopien des ApoE4 Allels vorhanden sind (Corder et al., 1993; Weidemann et al., 1989).

1.6 DIE PROTEOLYTISCHE SPALTUNG VON APP

Eine der zentralen Hypothesen zur Entstehung der Alzheimer Erkrankung ist die Hypothese der toxischen Amyloid β Kaskade (Hardy and Selkoe, 2002; Hardy and Higgins, 1992). Sie basiert auf der Annahme, dass die neuronale Degeneration durch ein Ungleichgewicht zwischen Produktion und Entfernung von toxischen A β -Peptiden, welche verschiedene Aggregierungsformen bilden können, verursacht wird. Der hier zu Grunde liegende Prozessierungsweg bezeichnet deswegen auch den amyloidogenen Spaltungsweg von APP. Dem gegenüber steht der sogenannte nicht-amyloidogene Weg (vgl. Abbildung 1-3). Diese Prozessierungswege sind durch die Aktivität von drei verschiedenen Proteasen gekennzeichnet. Im ersten Prozessierungsschritt konkurrieren hier α -Sekretasen mit β -Sekretasen um das Substrat APP (Buxbaum et al., 1998a; Skovronsky et al., 2000). Unter physiologischen Bedingungen wird APP zu ca. 95% durch α -Sekretase gespalten und dann über den nicht-amyloidogenen Weg weiter prozessiert. Über die sequenzielle Prozessierung beginnend mit β -Sekretase wird der amyloidogene Prozessierungsweg eingeschlagen.

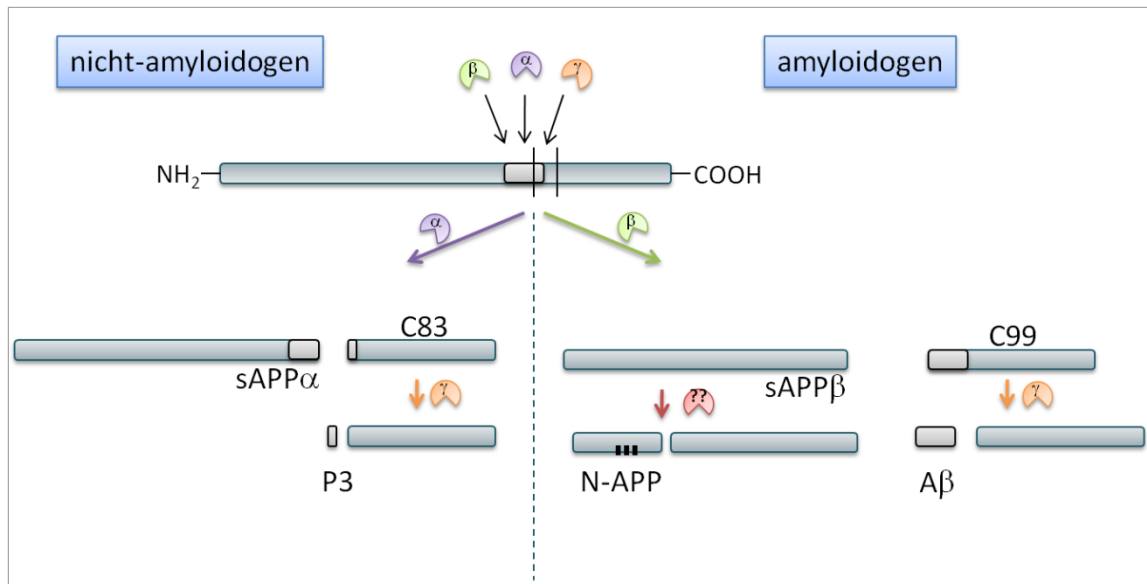


ABBILDUNG 1-3: Schematische Darstellung der proteolytischen Spaltung von APP. (adaptiert nach Nikolaev et al., 2009) APP ist mittig als Transmembranprotein abgebildet. Dabei stellt der graue Bereich Aβ dar. Die Schnittstellen für β-, α- und γ-Sekretase sind über Pfeile skizziert. Rechts in der Abbildung ist der amyloidogene Prozessierungsweg dargestellt. Er ist gekennzeichnet durch β-Sekretase-Spaltung resultierend in der N-terminalen Ektodomäne sAPPβ (*soluble/secreted APPβ*) und einem C-terminalen Fragment C99. C99 wird durch γ-Sekretasen zu Aβ und AICD (*APP intracellular C-terminal domain*) prozessiert. Eine weitere Prozessierung von sAPPβ durch eine unbekannte Protease resultiert in einem N-terminalen Fragment und einem nicht weiter spezifizierten C-terminalen Teilfragment von sAPPβ. Der nicht amyloidogene Weg ist durch α-Sekretase-Spaltung charakterisiert, welche in der Bildung der Spaltprodukte sAPPα (*soluble/secreted APPα*) und C83 resultiert. Nach dem Schnitt der γ-Sekretase entstehen aus C83 das lösliche Protein p3 und AICD.

1.6.1 DIE NICHT-AMYLOIDOGENE PROZESSIERUNG VON APP

Der nicht-amyloidogene Prozessierungsweg umfasst im ersten Schritt die Spaltung des Amyloid Precursor Proteins durch membranständige α-Sekretasen. Hierbei sind in Säugern verschiedene Proteasen der ADAM-Familie (*a disintegrin and metalloprotease*) bekannt, die α-Sekretase-Aktivität besitzen. Zu diesen zählen unter anderem ADAM9, ADAM10 und ADAM17 (auch bekannt als TACE) (Lichtenthaler, 2011). Die resultierenden Spaltprodukte sind zum einen die N-terminale Ektodomäne von APP (sAPPα) und ein in der Membran verankertes C-terminales APP-Fragment C83. Die Schnittstelle der α-Sekretase liegt innerhalb der Aβ-Sequenz in einer Distanz von 10-13 Aminosäuren zur Membran zwischen Lys16 und Leu17, so dass die Generierung von Aβ unterbunden wird (Esch et al., 1990). Die Prozessierung von APP durch α-Sekretasen findet im sekretorischen Transportweg vom Trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran oder an der Plasmamembran direkt statt

(Chyung and Selkoe, 2003; Sisodia, 1992). Hierbei zeigt ADAM10 eine regulative und im Gegensatz zu ADAM9 und ADAM17 auch eine konstitutive α -Sekretase-Aktivität bezüglich der APP-Prozessierung auf (Endres et al., 2005; Fahrenholz, 2007). Das 83 Aminosäure große C83-Fragment wird dann entweder durch die hochmolekulare membranständige γ -Sekretasen an drei verschiedenen Positionen gespalten (ϵ , ζ , γ), was in der Generierung der beiden Fragmente p3 und AICD (*APP intracellular C-terminal domain*) resultiert oder aber C83 wird reinternalisiert und in Lysosomen abgebaut. Das lösliche Protein p3 wird extrazellulär sezerniert und konnte in diffusen Amyloid-Ablagerungen in ausgewählten Hirnarealen nachgewiesen werden (Higgins et al., 1996; Postina, 2008). Die genaue Funktion von p3 ist bislang noch ungeklärt. Doch ist bekannt, dass p3 in einer β -Faltblattstruktur vorliegen kann und dadurch die Tendenz Aggregate zu bilden erhöht ist. Es sind bisher nur fibrilläre Aggregate und keine intermediären Aggregierungsformen wie Oligomere detektiert worden (Dulin et al., 2008). In vitro konnte p3 neuronale Apoptose mit einer geringeren Toxizität als A β induzieren (Wei et al., 2002a; Wei et al., 2002b).

Der nicht-amyloidogene Weg führt wie oben beschrieben zur Produktion von sAPP α unter gleichzeitiger Unterbindung der Produktion von A β . In neuronalen Zellen führt dies zu einem neuroprotektiven Effekt, wobei dem löslichen sAPP α verschiedene Funktionen zugesprochen werden. Hierzu zählen die Stimulation von Zellproliferation und Zelladhäsion, die Modulation der Erregbarkeit von Neuronen und ein Einfluss auf synaptische Plastizität (Ishida et al., 1997). Ferner wurde eine sAPP α -vermittelte Protektion gegen zellulären Stress durch die Stabilisierung der intrazellulären Kalziumhomöostase durch die Aktivierung von Guanylat-Zyklase nachgewiesen (Mattson et al., 1993b; Mattson and Furukawa, 1998; Mattson et al., 1999). Des Weiteren übt sAPP α seine Protektion über die Aktivierung des anti-apoptotischen NF- κ B-Signalweges aus (Barger and Mattson, 1996). In diesem Zusammenhang wurde bereits versucht die Aktivität der α -Sekretase spezifisch zu erhöhen, um deren Potential als therapeutischen Mittel für die Behandlung der Alzheimer Erkrankung zu nutzen. Hier zeigte, innerhalb eines Alzheimer-Mausmodells, eine moderat erhöhte Expression von ADAM10, eine erhöhte Sekretion von sAPP α . Die Generierung von A β -Peptiden und dadurch die Bildung von Plaques war ebenfalls verringert (Postina et al., 2004). Des Weiteren wurde eine erhöhte kortikale Synaptogenese festgestellt. Im Gegensatz dazu konnte eine massive Überexpression von ADAM10 in Zusammenhang mit erhöhtem Risiko für epileptische Anfälle, Inflammation und neuronaler Schädigung gebracht werden (Clement et al., 2008).

Diesen Befunden entsprechend kritisch, scheint eine direkte Modulation der α -Sekretase zu sein. Eine weitere Möglichkeit indirekt die Aktivität der α -Sekretasen zu erhöhen, zeigten Ansätze über die Modulierbarkeit der Membranfluidität. Hier stellen Statine und Omega-3 Fettsäuren eine Möglichkeit zur Erhöhung der Membranfluidität dar (Kirsch et al., 2003a; Kirsch et al., 2003b; Lim et al., 2005). Der Einsatz von Omega-3 Fettsäuren, im Besonderen von Docosahexaensäure (DHA), und deren Wirkung auf die Prozessierung von APP wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. DHA gehört zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren, welche essentiell für die Regulation der Membranfluidität sind (vgl. 1.5.). In diesem Zusammenhang gibt es mehrere Hinweise auf eine Modulation der Membranfluidität durch ungesättigte Fettsäuren, die sich auf die Prozessierung von APP auswirkt (Kojro et al., 2001; Peters et al., 2009; Yang et al., 2010). Hierbei zeigte sich eine unterstützende Wirkung hinsichtlich der α -Sekretase-abhängigen Prozessierung. Darüber hinaus sind für DHA protektive Effekte gegen A β -induzierter Neurotoxizität bekannt (Green et al., 2007; Hossain et al., 2009; Oksman et al., 2006; Sahlin et al., 2007; Wang et al., 2009).

1.6.2 DIE AMYLOIDOGENE PROZESSIERUNG VON APP

Dem amyloidogenen Prozessierungsweg liegt eine sequenzielle Spaltung des APP durch β -Sekretase und γ -Sekretase zu Grunde. Der β -Sekretase Schnitt liegt in der extrazellulären Domäne von APP zwischen Aminosäure 596 und Aminosäure 597 am N-terminalen Ende der A β Sequenz. Die somit entstehende Ektodomäne sAPP β ist damit im Vergleich zum Spaltprodukt nach α -Sekretase Prozessierung um 17 Aminosäuren kürzer (Seubert et al., 1993). Ein Vergleich dieser beiden so ähnlichen Spaltprodukte in Bezug auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften, ergab ein bis zu 100fach höheres Potential von sAPP α (Furukawa et al., 1996b).

Das verbleibende, in der Membran verankerte C-terminale Fragment (C99), besteht aus 99 Aminosäuren und wird ebenso wie C83 im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg anschließend durch die γ -Sekretase weiter prozessiert. Die Position der Schnittstelle der β -Sekretase ermöglicht demnach die Generierung von A β durch anschließende γ -Sekretase Spaltung.

Die prominenteste β -Sekretase BACE1 (*β -site APP-cleaving enzyme 1*) und dessen Homolog BACE2 (*β -site APP-cleaving enzyme 2*) gehören zu den Aspartatproteasen (Vassar et al., 1999). Beide β -Sekretasen gleichen sich in ca. 64% ihrer Aminosäuresequenz, doch wird BACE2 im Gegensatz zu BACE1 nur gering in neuronalen Zellen exprimiert. Während

BACE2 APP unspezifisch auch innerhalb der A β Sequenz spaltet, zeichnet sich BACE1 als erheblich spezifischere Protease aus (Bennett et al., 2000; Farzan et al., 2000). Dementsprechend wird der Aktivität von BACE1 eine höhere Relevanz innerhalb der Erkrankung an Alzheimer zugesprochen. Durch Homodimerisierung von BACE1-Proteinen (Schmechel et al., 2004), welche hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum und dem Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert sind, erhöht sich die Substrat-Affinität im Vergleich zum Monomer (Westmeyer et al., 2004). Weiterhin ist bekannt, dass BACE1 eine mit der familiären Alzheimer Erkrankung assoziierte APP-Mutante (schwedische APP-Mutante), mit einer 10-100fach höheren Effizienz spaltet als Wildtyp-APP. Für eine direkte Assoziation mit der Alzheimer Krankheit sprechen diverse Studien, die erhöhte BACE1 Level und Enzymaktivität bei Alzheimer-Patienten im Gehirn bzw. in der Cerebralflüssigkeit gefunden haben (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2004; Mulder et al., 2010).

Es ist davon auszugehen, dass sich BACE1 als therapeutischer Ansatzpunkt in der Behandlung der Alzheimer Erkrankung ebenfalls anbietet, da in verschiedene Studien mit BACE1-Knockout Mausmodellen ein normaler Phänotyp gezeigt werden konnte (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001b; Ohno et al., 2004). Weiterhin scheint ein BACE1 Knockout im transgenen AD-Modell A β -Amyloidose und kognitive Defizite zu verringern (Laird et al., 2005; Singer et al., 2005). Doch nachfolgende Studien am Mausmodell zeigen, dass die Nachkommen von BACE1 Null Mutanten eine erhöhte Sterberate innerhalb der ersten Wochen nach der Geburt aufweisen. Die überlebenden Nachkommen zeigten u. A. Hypermyelinisierung von peripheren Nerven, veränderte elektrophysiologische Charakteristika von spannungsabhängigen Natriumkanälen und neurologische Auffälligkeiten wie eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit (Dominguez et al., 2005).

Die innerhalb der unterschiedlichen Prozessierungswege entstehenden C-terminalen Fragmente C99 und C83 stellen Substrate der γ -Sekretase dar. Die γ -Sekretase zeichnet sich als hochmolekularer Enzymkomplex aus, der aus Präsenilinen, Nicastrin, APH-1 (*Anterior Pharynx Defective 1*) und PEN-2 (*Präsenilin-Enhancer-2*) besteht (Capell et al., 2005; De Strooper et al., 1998). Die Präseniline durchspannen hierbei mehrfach die Membran und bilden so vermutlich das aktive Zentrum der γ -Sekretase (Haass, 2004). Im amyloidogenen Prozessierungsschritt durch diese membranständige Sekretase entsteht je nach Position der Spaltung entweder A β 40 oder A β 42 (Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992) und das entsprechende AICD (Sastre et al., 2001; Selkoe, 2001b). Diese beiden Schnittstellen stellen die prominentesten dar, doch können A β Fragmente anderer Größe durchaus auf Grund der Unspezifität der γ -Sekretase entstehen (LaFerla, 2002). Am häufigsten jedoch entsteht A β 40, während die 42 Aminosäure große Variante nur ca. 5 -10%

der Menge an A β 40/42 ausmacht. Auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaften bilden A β Peptide verschiedene Aggregierungszustände aus. Aus Oligomeren entstehen zunächst Protofibrillen, die sich dann zu Fibrillen aneinander lagern (Hardy and Selkoe, 2002), wobei die Protofibrillen dabei den charakteristischen Hauptbestandteil der Amyloid-Plaques liefern. Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Erkrankung, dem neurodegenerativen Aspekt und der A β Produktion konnte für oligomere Aggregate und nicht für die fibrillären Ablagerungen in den Amyloid-Plaques gefunden werden (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999). A β 40 und A β 42 unterscheiden sich hauptsächlich auf Grund ihrer Toxizität. A β 42 wird vornehmlich im ER gebildet, aggregiert schneller und ist die toxischere Form, wohingegen A β 40 hauptsächlich im TGN von Neuronen produziert wird. In nicht-neuronalen Zellen wird A β generell an der Zelloberfläche generiert (Hartmann et al., 1997).

Ferner ist bekannt, dass die Prozessierung von APP durch verändertes Ca²⁺-Signaling beeinflusst wird. Hinweise dafür geben die Spaltprodukte A β 40 und A β 42, die Ca²⁺ durchlässige Poren in der Plasmamembran bilden können, was wiederum zu erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Spiegeln führt (Arispe et al., 1993). Diese Destabilisierung der Kalziumhomöostase verursacht die Generation von freien Radikalen (Brustovetsky et al., 2005), Peroxidation von Lipiden (Lovell et al., 2001) und Apoptose (Mattson, 1994), was zur A β -Toxizität beiträgt. Darüber hinaus verringert A β die Aktivität von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen (Nimmrich et al., 2008).

Frühe Anzeichen der Alzheimer Krankheit sind Einschränkungen in der Gedächtnisleistung und Defizite in kognitiven Leistungen wie Lernprozessen. Dieses steht in engem Zusammenhang mit dem Prozess der Langzeitpotenzierung (LTP, *long term potentiation*), für welche in elektrophysiologischen Untersuchungen oligomere A β -Aggregate, die LTP-inhibitorisch fungieren, verantwortlich gemacht werden konnten (Walsh et al., 2002a).

Neben den Spaltprodukten A β bzw. p3 entstehen nach der Prozessierung der C-terminalen Fragmente entsprechende AICD. Auf Grund der Ähnlichkeit von Notch und APP in ihrer proteolytischen Spaltung, lag die Vermutung nahe, dass die AICD ähnliche Eigenschaften und Funktionen wie NICD (*Notch intracellular domain*) aufweisen könnte (Kimberly et al., 2001). Notch wird sequenziell von ADAM17 und einer Präsenilin-abhängigen γ -Sekretase gespalten. Das dann sezernierte NICD assoziiert mit CBF1 (*protein C binding factor 1*), transloziert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionsfaktor.

Das an sich instabile AICD kann von verschiedenen Kofaktoren, z.B. Fe65, Tip60 und CP2 gebunden werden (Bressler et al., 1996; Fiore et al., 1995; Zambrano et al., 1998). In den Zellkern transloziert übt es eine genregulatorische Funktion auf verschiedene Zielgene aus

(Cao and Sudhof, 2001; Gao and Pimplikar, 2001; Muller et al., 2008). Des Weiteren ist eine Funktion des AICD-Komplexes an der Regulation der ER-Kalziumhomöostase bekannt (Leissring et al., 2002). Die Rolle von AICD in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit ist nicht genau geklärt. Doch konnte bisher gezeigt werden, dass eine Überexpression von AICD, eine Reihe von Vorgängen initiiert, die mit der Aktivierung von GSK-3 β beginnt und letztendlich in Neurodegeneration finalisiert (Ghosal et al., 2009). Neben der Aktivierung von GSK-3 β konnte eine erhöhte Phosphorylierung von CRMP-2 (*collapsin response mediator protein 2*) festgestellt werden. Diese beiden Phänomene sind auch im Alzheimer Patienten wieder zu finden (Hooper et al., 2008), was AICD zu einem zusätzlichen pathogenen Faktor macht. Unterstützend für eine Beteiligung von AICD in der Manifestierung der Alzheimer Krankheit sind auch die Befunde, dass eine Induktion von AICD eine verringerte Expression von ApoJ/Clusterin nach sich zieht (Muller et al., 2007), da verschiedene Genvarianten von ApoJ/Clusterin als genetische Risikofaktoren für die Alzheimer Krankheit identifiziert wurden (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009; Van Broeckhoven, 2010).

1.7 DIE STRUKTUR UND PHYSIOLOGISCHE FUNKTION DES AMYLOID PRECURSOR PROTEINS

Das Amyloid Precursor Protein ist das am besten charakterisierte Protein innerhalb der APP-Familie. Auf Grund zahlreicher posttranslationaler Modifikationen wie N- und O-Glykosylierung sowie Tyrosin-Sulfatierung und alternativen Spleißens spricht man von einer heterologen Proteinfamilie (Weidemann et al., 1989). Zu dieser Proteinfamilie gehören seine Säuger-Homologe APLP1 (*APP like Protein 1*) und APLP2 (*APP like Protein 2*), das *Drosophila* APPL und das *C. elegans* APL-1. Während APP und APLP2 ubiquitär exprimiert werden, findet sich APLP1 ausschließlich in neuronalen Zellen. Im Gegensatz zu den APLPs besitzt APP jedoch die charakteristische A β -Sequenz.

APP ist ein integrales Typ1 Membranprotein mit einer Größe von 100 kD-130 kD, das ubiquitär exprimiert wird (Selkoe et al., 1988). Durch alternatives Spleißen, entstehen verschiedene Isoformen, wobei APP695, APP770 und APP751 die häufigsten darstellen (Sandbrink et al., 1994; Selkoe, 1994). Die 695 Aminosäuren große Spleißvariante wird vornehmlich in neuronalen Zellen exprimiert (Wertkin et al., 1993) und unterscheidet sich von den anderen Isoformen durch das Fehlen von Exon 7 und 8 (Kang and Muller-Hill, 1990). Die beiden anderen genannten Isoformen werden in allen anderen Geweben und Zelltypen gebildet (Haass et al., 1994; Koo et al., 1990b; Neve et al., 1988; Yoshikai et al., 1990). Alle

APP-Isoformen finden sich in der Zellmembran, in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER), des Trans-Golgi Netzwerkes (TGN) und der Mitochondrien (Hartmann et al., 1997; Selkoe et al., 1996). Eine Assoziation von APP mit sogenannten *Lipid rafts* (cholesterinhaltige Mikrodomänen der Zellmembran) wurde durch Eehalt und Kollegen erstmals belegt (Eehalt et al., 2003). APP lässt sich grob in eine große extrazelluläre Domäne (Ektodomäne), die ungefähr 88% des gesamten Proteins ausmacht, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Domäne einteilen (Kang et al., 1987; Reinhard et al., 2005; Tanzi et al., 1987). Eine detaillierte Topologie ist in Abbildung 1-4 gezeigt.

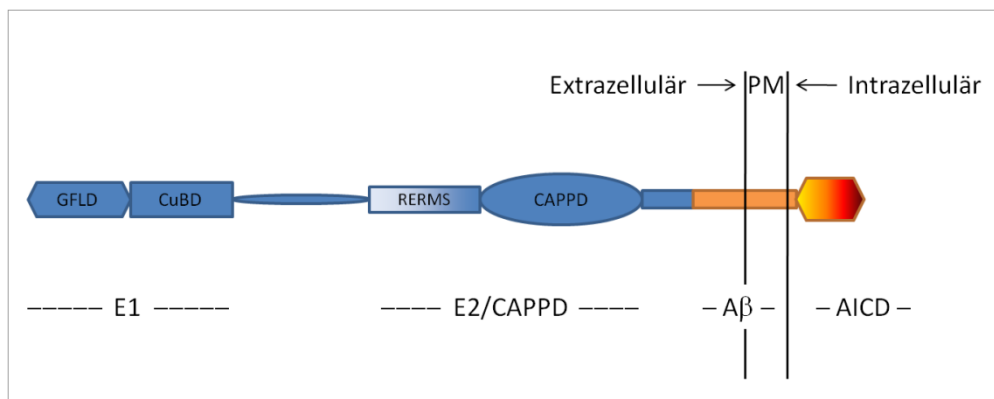


ABBILDUNG 1-4: Topologie der Domänenstruktur von APP695. (adaptiert nach Reinhard et al. 2005) Die neuronale Spleißvariante APP695 besitzt eine E1-Domäne, die über einen Linker mit der E2/CAPPD verbunden ist. E1 selbst setzt sich aus der GFLD (*growth factor like domain*) und der CuBD (*Copper binding domain*) zusammen. Beide Großdomänen liegen extrazellulär. Die Begriffe E2 und CAPPD (*Central APP Domain*) werden analog für die zweite Domäne im Extrazellulärraum verwendet. Die Aβ-Sequenz schließt sich im juxtamembranen Bereich an. Ihr N-terminales Ende liegt innerhalb der Plasmamembran (PM). Intrazellulär befindet sich die AICD.

Obwohl APP seit vielen Jahren zentraler Gegenstand der Alzheimer-Forschung ist, ist seine physiologische Funktion noch weitgehend ungeklärt, auch wenn ihm eine Beteiligung an zahlreichen Prozessen zugesprochen wird. Hierzu zählen Proteaseinhibition, Zelladhäsion (Kibbey et al., 1993; Schubert et al., 1989; Soba et al., 2005), Synaptogenese (Copanaki et al., 2010), Neuritenwachstum (Milward et al., 1992), Signaltransduktion (Nishimoto et al., 1993) und Neuroprotektion (Furukawa et al., 1996b; Kögel et al., 2005; Kögel et al., 2003; Mattson, 1997; Schubert and Behl, 1993; Small et al., 1994). Seit dem Gelingen der Klonierung der APP cDNA wurde für APP eine Funktion als Rezeptor an der Zelloberfläche vermutet. Ähnlichkeiten mit dem Notch Rezeptor bestärkten diese Vermutung (zusammengefasst in Selkoe and Kopan, 2003). Aβ wird u.a. als ein potentieller Ligand gehandelt (Lorenzo et al., 2000; Lu et al., 2003). Mittlerweile konnte eine Vielzahl an

Interaktionspartnern von APP nachgewiesen werden. Hierzu gehören zum Beispiel Netrin-1, welches eine Funktion in der axonalen Wegfindung ausübt, F-Spondin oder Integrine, welche an der Bereitstellung von Zell-Zell- oder Zell-Matrixkontakte beteiligt sind (Ho and Sudhof, 2004; Lourenco et al., 2009; Young-Pearse et al., 2008). Besonders für die AICD, welches multiple funktionelle Motive und eine gut beschriebene Phosphorylierungsstelle besitzt, sind viele Interaktionspartner, die APP-vermittelte Funktionen in der Regulation des Metabolismus und intrazelluläre Singaltransduktion realisieren, beschrieben. Hierzu gehören die Adaptorproteine Fe65, Mint-1 und JIP1 (Bressler et al., 1996; Scheinfeld et al., 2002; Taru et al., 2002; Taru and Suzuki, 2004). Über das Adaptorprotein Fe65 kann APP mit LRP (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) interagieren, was zu einer Verhinderung der Internalisierung von APP führt, sodass APP für α -Sekretase Spaltung vermehrt zur Verfügung steht (Cam et al., 2004; Ulery et al., 2000). Für die E1 und E2 Regionen in der extrazellulären Domäne von APP sind Interaktionen mit extrazellulären Matrixproteinen und dem Proteoglykan Heparansulfat bekannt, was eine adhäsive Funktion von APP nahelegt (zusammengefasst in Small et al., 1999). Für die Bindung von Heparin an E1/E2 konnte eine Induktion für die APP-Dimerisierung gezeigt werden (Dahms et al., 2010). Auch kann APP Heterodimere mit anderen Familienmitgliedern aus der APP-Familie ausbilden (Kaden et al., 2009). Diese Dimerisierung steht in engem Zusammenhang mit der Modulation der APP-Prozessierung und der Bildung von A β Peptiden (Kaden et al., 2008; Munter et al., 2007). Für APP sind drei verschiedene Interaktionsmotive bekannt, die die Dimerisierung ermöglichen. Zwei davon sind in der Transmembransequenz und eine in der Ektodomäne lokalisiert (Behr et al., 1996; Rossjohn et al., 1999; Soba et al., 2005; Wang and Ha, 2004). Außerdem besitzt APP in seiner extrazellulären Domäne Bindestellen für Heparin, Kupfer, Zink und Collagen.

In der Embryonalentwicklung wird APP in Radialglia hoch exprimiert, was über die Vermittlung der Zelladhäsion zwischen Neuronen und Glia dazu führt, dass zukünftige Neurone korrekt im embryonalen Cortex positioniert werden. Der Expression von APP wird hierbei unter anderem die Vermittlung der Zelladhäsion zugesprochen (Trapp and Hauer, 1994). Weitere Hinweise auf die Funktion von APP ergaben sich aus Studien mit „knockout“ Mäusen. Obwohl APP-defiziente Mäuse generell in ihrer Entwicklung retardiert sind und Defizite in ihrem Verhalten aufweisen, sind die beobachteten Effekte erstaunlich mild im Hinblick auf das ubiquitäre Expressionsmuster und die hoch konservierte Struktur von APP. Der Verlust von APP zeigt sich in einem breiten neuronalen Phänotyp, der eine verringerte Bewegungsaktivität (Muller et al., 1994; Ring et al., 2007), eine reaktive Gliose (Zheng et al., 1995), zum Teil eine Corpus-callosum-Agenesie (Magara et al., 1999; Zheng et al., 1995) (fehlerhafte oder nicht vorhandene Bildung des Balken) und eine Hypersensitivität

gegenüber Kainat-induzierten Krampfanfälle (Steinbach et al., 1998) einschließt. Obwohl diese Phänotypen auf eine Funktion von APP im zentralen Nervensystem hinweisen, sind die verursachenden molekularen Mechanismen nicht genau verstanden. Der Verlust von Synapsen konnte im Hippocampus des *APP*-defizienten Mausmodells nicht beobachtet werden (Phinney et al., 1999), wohingegen die Analyse der Spine-Dichte in unterschiedlichen Ergebnissen resultierte. Priller und Kollegen konnten eine *APP*-Deletion mit einer zweifach gesteigerten Spine-Dichte im somatosensorischen Cortex von 4-6 Monate alten Mäusen korrelieren (Priller et al., 2006). Im Gegensatz dazu fanden Lee und Kollegen eine signifikante Reduktion der Spine-Dichte in den corticalen Schichten II/III und in hippocampalen Neuronen der CA1 Region von einjährigen *APP*-defizienten Mäusen (Lee et al., 2010). Eine Erklärung für die Diskrepanz in den verschiedenen Studien konnte derzeit nicht gegeben werden. Der Vermutung eines kompensatorischen Effekts innerhalb der APP-Familie wurde über die Generierung von Doppel- bzw. Dreifach-Knockouts nachgegangen. Eine alleinige *APLP1*-Defizienz zeigte im Mausmodell lediglich ein Wachstumsdefizit (Heber et al., 2000) und eine *APLP2*-Defizienz resultierte dem Anschein nach in einem normalen Phänotyp (von Koch et al., 1997). Die Generierung von *APP/APLP2* bzw. *APLP1/APLP2* doppeldefizienten Mäusen resultierte in einer perinatalen Letalität, die für *APP/APLP2* mit einer Penetranz von 80-100% bzw. für *APLP1/APLP2* mit einer 100%igen Penetranz einherging (Heber et al., 2000; von Koch et al., 1997). Eine duale Defizienz für *APP* und *APLP1* resultierte in fertilen lebensfähigen Nachkommen, die keine zusätzlichen Defizite zu denen der einzelnen Knockouts aufweisen (Heber et al., 2000). Eine kompensatorisch erhöhte Expression der erhalten gebliebenen APP-Familienmitglieder konnte weder in den Einzel- noch in den Doppel-defizienten Mäusen am Tag P0 festgestellt werden. Dafür zeigte sich im Gehirn von *APP*-defizienten Mäusen eine alters-abhängige Kompensation für *APLP1* und *APLP2* (Soba et al., 2005). Darüber hinaus ergaben immunohistologische Analysen der neuromuskulären Synapsen von *APP/APLP2* defizienten Mäusen Hinweise auf eine Funktion in der Entwicklung dieser. Die neuromuskulären Synapsen waren nur schwach ausgebildet und zeigten in der Präsynapse eine verringerte Anzahl an synaptischen Vesikeln, die mit einer defekten Transmitter-Ausschüttung einhergeht (Wang et al., 2005; Yang et al., 2005). Die Generierung von Mäusen mit einer Defizienz für *APP*, *APLP1* und *APP* in Kombination resultierte in einer perinatalen Letalität (Herms et al., 2004). Im Gegensatz zu den doppeldefizienten Mäusen zeigten diese histologische Veränderungen im Gehirn, wobei am häufigsten eine corticale Dysplasie ähnlich einer Typ II Lissenzephalie auftrat. Innerhalb der betroffenen Areale im dorsalen Bereich des Frontoparietallappens migrierten Neurone über ihre Position hinaus und reichten in die Marginalzone und den Subarachnoidspalt hinein. Ferner konnte für den kompletten Cortex eine Reduktion an

Cajal-Retzius-Zellen, die für die Produktion von Reelin, einem Protein das mitverantwortlich für die neuronale Migration und Positionsfindung ist, vermerkt werden (Herms et al., 2004).

Zusammenfassend kann eine funktionelle Kompensation in der APP-Familie für ihre essentielle physiologische Rolle in der postnatalen Entwicklung postuliert werden. Die Defizienz eines einzelnen Familienmitglieds kann von den Anderen weitestgehend ausgeglichen werden, wobei der Verlust von *APLP2* in Kombination mit *APP* bzw. *APLP1* letal ist. Die Viabilität der *APP/APLP1*-defizienten Mäuse lässt darauf schließen, dass nur *APLP2* in der Lage ist den Verlust von zwei APP-Familienmitgliedern zu kompensieren.

Im adulten Gehirn wird *APP* in hohem Maße in den Regionen exprimiert, in denen erhöhte synaptische Plastizität zu finden ist (Löffler and Huber, 1992; Ouimet et al., 1994). Das Expressionsniveau lässt sich durch eine Reiz-reiche Umgebung zusätzlich steigern (Huber et al., 1997). Ein spezifischer *APP*-Knockout in retinalen Ganglionzellen induziert eine Reduktion der metabolischen Aktivität in den Regionen, die durch diese innerviert werden (Herard et al., 2006). Dieser Befund könnte die Erklärung für die Gedächtnisdefizite bei *APP*-defizienten Mäusen sein (Dawson et al., 1999). Außerdem wird *APP* im adulten Gehirn eine weitere Funktion im axonalen Transport von Vesikeln zugeordnet (Back et al., 2007; Koo et al., 1990a; Sisodia, 2002). Es wird vermutet, dass der axonale Transport von *APP* zu den Synapsen mit einer direkten Bindung an der leichten Kette von Kinesin (KLC, *Kinesin Light Chain*), realisiert wird (Kamal et al., 2000). Darüber hinaus zeigte die erhöhte *APP*-Expression in einem Trisomie 21-Mausmodell einen verringerten retrograden Transport von NGF (*nerve growth factor*), resultierend in der Degeneration von cholinergen Neuronen im Vorderhirn (Salehi et al., 2006). Zusätzlich konnte *APP* als ein Hauptbestandteil viraler Partikel des Herpes simplex Virus, mit einer Funktion im anterograden Transport dieser Partikel, nachgewiesen werden (Cheng et al., 2011; Satpute-Krishnan et al., 2003; Satpute-Krishnan et al., 2006). Des Weiteren konnte eine Interaktion mit den hoch affinen Cholin-Transportern (CHT) über die C-terminale Domäne in Verbindung mit einem *APP*-Defizit, welches die CHT-Endozytose beeinflusste, gefunden werden (Wang et al., 2007). Zusammengenommen legen diese Studien eine Funktion von *APP* im Transport von Proteinen nahe.

Wichtige neurotrophe und neuroprotektive Funktionen von *APP* sind auf sein Spaltprodukt $sAPP\alpha$, welches innerhalb des nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg gebildet wird, zurückzuführen. Dass $sAPP\alpha$ die Zellproliferation fördert zeigte eine erste Studie an Fibroblasten von Saitoh und Kollegen (Saitoh et al., 1989). Später gelang es die wachstumsfördernde Wirkung auf ein Pentapeptid-Motiv RERMS in der E1-Domäne zu beziehen (Ninomiya et al., 1993). Weitere Studien belegten ähnliche Effekte durch Injektion

von sAPP α in das Gehirn von Ratten, wodurch eine höhere Synapsendichte und eine verbesserte Gedächtnisleistung verzeichnet werden konnte (Meziane et al., 1998). Nach der Induktion einer traumatischen Hirnschädigung resultierte die Applikation von sAPP α in einer reduzierten neuronalen Apoptose und ermöglichte eine verbesserte funktionelle Wiederherstellung (Thornton et al., 2006). In diesem Zusammenhang konnten vor kurzem Hinweise geliefert werden, dass für die neuroprotektive Wirkung von sAPP α die GFL-Domäne und auf die E2-Domäne verantwortlich sind (Corrigan et al., 2011). Diesem Befund stehen Daten, dass sAPP α und nicht sAPP β neuroprotektiv wirkt (Furukawa et al., 1996b), kritisch entgegen, da beide APP-Fragmente die besagten Domänen besitzen. Des Weiteren ist sAPP α in der Lage durch A β induzierte erhöhte Ca²⁺-Level auszugleichen (Goodman and Mattson, 1994). Darüber hinaus wurden sAPP α vorangegangenen Studien neuroprotektive Eigenschaften unter Bedingungen von zellulärem Stress zugesprochen (Furukawa et al., 1996b; Kögel et al., 2005; Kögel et al., 2003; Mattson, 1997; Schubert and Behl, 1993; Small et al., 1994). So ist z.B. bekannt, dass sAPP α der durch Glutamat induzierten Erhöhung des zytosolischen Ca²⁺-Spiegels in hippocampalen Neuronen entgegen wirken kann und die Neurone dadurch vor einem exzitotoxischen Zelltod geschützt werden (Barger and Mattson, 1995).

2 ZIELSETZUNG

Das Amyloid Precursor Protein spielt eine zentrale Rolle für die Pathophysiologie der Alzheimer Krankheit. So wird im amyloidogenen Prozessierungsweg APP sequenziell durch β - und γ -Sekretase gespalten, was in der Generierung des toxischen Fragments A β resultiert. Im nicht-amyloidogenen Prozessierungsweg wird APP an der Zelloberfläche durch α -Sekretasen gespalten und die N-terminale Ektodomäne sAPP α wird in den Extrazellularraum sekretiert. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten bereits potente neuroprotektive Wirkungen für sAPP α festgestellt werden. Für die vorliegende Arbeit galt die Annahme, dass der Verlust dieser physiologischen neuroprotektiven Funktion von APP ein wesentlicher Faktor in der Alzheimer-Ätiologie darstellen könnte.

Zur Untersuchung der physiologischen Funktionen wurden (A) sekretiertes sAPP α aus konditionierten Überständen APP-überexprimierender HEK Zellen, (B) aufgereinigtes rekombinantes sAPP α aus einem weiteren Zellsystem (COS7 Zellen) und (C) aufgereinigtes sAPP α aus einem transformierten *Pichia pastoris* Hefestamm verwendet. Um sAPP α auf seine neuroprotektive, anti-apoptotische Wirkung zu untersuchen wurden exemplarisch zwei mit der Alzheimer Krankheit assoziierte Stressbedingungen untersucht: proteasomaler Stress und Störungen der Kalziumhomöostase. Das proteasomale Schädigungsmodell wurde durch die Applikation eines potenten irreversiblen Proteasom-Inhibitor Epoxomicin etabliert. Für die Störung der Kalziumhomöostase wurden Thapsigargin, ein Inhibitor der sarko- und endoplasmatischen Ca²⁺-ATPasen verwendet. Zur Untersuchung der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen wurde der pro-apoptotische JNK/c-Jun Signalweg und der anti-apoptotische PI3K/Akt Signalweg betrachtet. Die Analysen der Effektorcaspase-Aktivität sollten Aufschluss darüber geben, ob sAPP α das neuroprotektive APP-Fragment in diesem Kontext darstellt. Durch den Einsatz von Inhibitoren sollte untersucht werden, ob eine Inhibition von JNK durch sAPP α gegeben ist und somit die protektive Eigenschaft über die Inhibition des JNK/c-Jun Signalweges vermittelt wird.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Einfluss von Omega-3 Fettsäuren, im speziellen von Docosahexaensäure, auf die Prozessierung von APP untersucht werden. Ein pharmakologischer Ansatz zur Erhöhung der α -Sekretase-abhängigen Spaltung von APP könnte zur Prävention von Morbus Alzheimer beitragen. Darauf aufbauend sollte untersucht werden ob eine Erhöhung der sAPP α -Produktion in Abhängigkeit von einer erhöhten Membranfluidität durch den Einbau von DHA in die Zellmembranen, vor Stress-induzierter Apoptose schützen kann. Die Problematik der Applikation von Fettsäuren im

Zellkultursystem sollte über eine Verpackung in Liposomen gelöst werden, was gegebenenfalls *in vivo* Anwendung finden könnte.

3 MATERIAL

3.1 ZELLKULTURMATERIAL

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit verfügbar, in Qualitäten wie „pro analysis“ oder „molecular biology grade“ verwendet. Sterile Verbrauchsmaterialien, wie Kulturflaschen, Gefäße zur Aufbewahrung von Medien, Stripetten und Reaktionsgefäße wurden von folgenden Firmen bezogen: Nunc (Wiesbaden), Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Becton Dickinson (BD, Heidelberg) und Sarstedt (Nümbrecht).

Die auf Mykoplasmen- und Keimfreiheit getesteten Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen:

TABELLE 3.1: Zellkulturmaterial

Produkt	Hersteller
10 x PBS	Invitrogen
50 x MEM-Aminosäure-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DMEM Dulbecco's modified eagle medium 4,5 g/L D-Glu	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin	Invitrogen
Glutamax I (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Nu-Serum IV	Axxora, Lörach
PBS-Pulver (1x) nach Dulbecco	AppliChem
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Pferdeserum (HS, "horse serum")	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe

3.2 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL

TABELLE 3.2: Molekularbiologische Substanzen

Substanz	Hersteller
1x Fast Start Universal Probe Master Mix	Roche
3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonat (Chaps)	AppliChem
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich
Ac-DEVD-AMC	Axxora
Acrylamide-Bis Lösung (37,5:1) 40% (PAA)	Serva
Ammoniumperoxidsulfat	AppliChem
Aqua ad iniectabilia	DeltaPharma Boehringer
B27-Supplement (50x)	Invitrogen
Biotin	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich
Butylhydroxytoluol (BHT)	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose-Lösung	Sigma-Aldrich
Dichlormethan	Roth
dNTPs	Invitrogen
Docosahexaensäure (DHA)	Sigma-Aldrich
Docosansäure (DA)	Sigma-Aldrich
DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)	AppliChem
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	AppliChem
EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure)	Applichem
Ethanol (EtOH)	Roth
First Strand Buffer	Eppendorf, Hamburg
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich
HEPES (Buffered Saline Solution)	Cambrex
Hoechst 3342	Sigma-Aldrich
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Merck

Substanz	Hersteller
Kaliumphosphat (K_3PO_4)	Sigma-Aldrich
Kalziumchlorid ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich
Lipoid®S100	Lipoid, Ludwigshafen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	Fluka
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	MP Biomedicals
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem
oligo-dT-Primer	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Pepton	Sigma-Aldrich
Ponceau S (C.I.27195) Certistain	Roth
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Biorad, München (#161-0374)
Propidium Iodide Lösung (1,0 mg/mL)	Sigma-Aldrich
random Primer	Invitrogen
RNaseZapR	Ambion, Darmstadt
Roti®-Quant UN 1760	Roth
Simply Blue – SafeStain	Invitrogen
Sucrose	AppliChem
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Trypanblaulösung (0,4%)	Bio Whittaker
Tween® 20	AppliChem
Wasserstoffchlorid (HCl)	Roth
YNB ("yeast nitrogen base")	Invitrogen
β -Mercaptoethanol-2 p.a.	Fluka

TABELLE 3.3: Antikörper

Primärantikörper	Typ	Hersteller
anti-APP	Maus	Sigma-Aldrich (#A8717)

Primärantikörper	Typ	Hersteller
anti-APP (22C11)	Maus	Millipore/Chemicon (#MAB348)
anti-APP (6E10)	Maus	Covance (#SIG29300)
anti-GAPDH	Maus	Calbiochem (#CB1001)
anti-P-JNK (81E11)	Kaninchen	Cell Signaling (#4668)
anti-Tubulin (DM1A)	Maus	Sigma-Aldrich (#T9026)

Sekundärantikörper	Typ	Hersteller
anti-Maus	IRDye680	LI-COR, USA
anti-Kaninchen	IRDye680	LI-COR, USA
anti-Maus	IRDye800	LI-COR, USA
anti-Kaninchen	IRDye800	LI-COR, USA

TABELLE 3.4: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay Kit®	Pierce, Perbio Science, Bonn
P-JNK ELISA	Cell Signaling
Qiashredder	Qiagen
RNeasy Midi Kit	Qiagen
sAPP α ELISA	IBL, America
TaqMan Gene-Expression Assay: APP	Applied Biosystems
TaqMan Gene-Expression Assay: TBP	Applied Biosystems

TABELLE 3.5: In dieser Arbeit verwendete Enzyme, Inhibitoren und Pharmaka

Bezeichnung	Hersteller
Aprotinin	AppliChem
BI78D3	Biozol
DNase	Invitrogen
Epoxomicin	Biotrend
Leupeptin	AppliChem
LY294002	Sigma-Aldrich
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Sigma-Aldrich
Papain	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	AppliChem

Bezeichnung	Hersteller
Phosphatase-Inhibitor Mix	Roche
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Protease-Inhibitor Mix	Sigma-Aldrich
SP600125	Calbiochem
Superscript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen
Tetrodotoxin	Tocris
Thapsigargin	Alexis
Trypsin-Inhibitor, Type II-0 Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich

3.3 GERÄTE UND SOFTWARE

TABELLE 3.6: In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Analytik-Waage BL 1500S	Sartorius, Göttingen
Autoklav Systec 2540 EL	Wettemberg
Autoklav Varioklav	Biomedis, Gießen
Blotkammer (Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell)	Biorad, München
Branson-Sonifier (Typ Cell disruptor B15)	Branson Ultrasonics Corp
Cleanbench (Heraeus)	Heraeus, Hanau
Cleanbench (TECNOFLOW)	Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Elektrophoresekammer für PAGE (Protean II und IV)	Biorad
Exsikkator	Roth
Falconroller Typ RM5	Karl Hecht KG
Gelstand für SDS-PAGE Gelelektrophorese	Biorad
Geltrockner Phero-Temp 60	Biotec-Fischer
GeneAmp 5700 Sequence Detector	Applied Biosystems
Inversmikroskop (Eclipse TS100)	Nikon, Düsseldorf
Kaffeemaschine	Krups
Laborwaage Universal (U 4600 P+)	Sartorius, Göttingen
Milli-Q Q-Gard 1-Reinstwasseranlage	Millipore
Multifunction Microplate Reader / Tecan Reader	Genios
Odyssey Infrarot Imager	LI-COR

Bezeichnung	Hersteller
pH-Messgerät Lab 850	Schott-Instruments
Photometer GeneQuant	Amersham
Spannungsgerät (PowerPac HC Power Supply)	Biorad
Thermocycler (Mastercycler)	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus, Düsseldorf
Tischzentrifuge (Biofuge stratos)	Heraeus
Ultraschallbad (Sonorex RK 105H)	Bandelin
Wärmeschrank	Heraeus
Wärmeschrank	WTB Binder, Tuttlingen
Wasserbad (10 L)	Minitüb, Tiefenbach
Zellkulturschrank (HeraCell)	Heraeus
Zentrifuge (J2, Rotor JA-20.1)	Beckman

TABELLE 3.7: In dieser Arbeit verwendete Software

Name	Hersteller
Adobe Acrobat 9 pro	Adobe
Adobe Illustrator CS3	Adobe
Adobe Photoshop CS3	Adobe
EndNote X.02	Thomson Research Soft
GeneAMP 5700 SDS	Applied Biosystems
Imaging Software	LI-COR
MS Office 2007	Microsoft
SPSS 12.0	IBM, München
XFluor4	Makro Excel

4 METHODEN

4.1 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITEN

4.1.1 KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN VON ZELLINIEN UND PRIMÄRZELLKULTUREN

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Primärzellkulturen wurden bei 37 °C in einem Inkubator unter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Die Zellkulturmedien wurden mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin supplementiert. Die gebrauchsfertigen Medien konnten für maximal 4 Wochen, bei 4 °C gelagert, verwendet werden. Vor Benutzung wurden die Medien auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

4.1.2 ZELLINIEN

Parentale HEK293 Zellen (*human embryonic kidney cells*) und APP überexprimierende HEK-APP Zellen wurden wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben mit DMEM + 4,5 g/L D-Glucose kultiviert, wobei HEK-APP Zellen in regelmäßigen Abständen mit 400 µg/ml Geneticin selektioniert wurden. Dem Medium zur Kultivierung der PC12 Zellen wurde neben 10% FCS, 5% Pferdeserum zugesetzt. Auch hier wurde als Grundmedium DMEM + 4,5 g/L D-Glucose verwendet.

4.1.3 SUBKULTIVIERUNG

Zur Subkultivierung wurden die humanen HEK293 Zelllinien alle drei Tage in einem Verhältnis von 1:4 gesplittet. Hierfür wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit vorgewärmten PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA aus dem Zellverband heraus- und vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst. Das Abstoppen der Wirkung des Trypsins erfolgte über Zugabe von Medium. Diese Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen transferiert und für 3 min bei 200 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in einem definierten Volumen resuspendiert und im entsprechenden Verhältnis in die Zellkulturgefäße überführt.

4.1.4 EINFRIEREN VON ZELLEN

Zur mittel- und langfristigen Lagerung von Zellen wurden diese in einem Stickstofftank in der Gasphase bei ca. $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert. Um die Bildung von Eiskristallen zu verhindern wurde dem Einfriermedium 20% DMSO zugesetzt. Vom Einfriermedium wurde in zuvor beschriftete Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) 750 μl vorgelegt. Die einzufrierenden Zellen wurden innerhalb ihrer linearen Wachstumsphase trypsinisiert und für 3 min bei $200 \times g$ pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet dann in Medium resuspendiert. In jedes vorbereitete Kryoröhrchen wurden 750 μl Zellsuspension überführt. Dies entsprach einer Zellzahl von ca. $2,5 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ pro Kryoröhrchen. Die befüllten Kryoröhrchen wurden vorerst in einer Kryobox (Mr. Frosty) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die verwendete Kryobox gewährleistet durch den mit Isopropanol gefüllten Mantel ein langsames Abkühlen der Zellen (ca. $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) bis auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Einen Tag später konnten die Zellen in den Stickstofftank transferiert werden.

verwendete Lösungen:

Einfriermedium: 80% FCS + 20% DMSO

4.1.5 AUFTAUEN VON ZELLEN

Pro Kryoröhrchen wurde ein 15 ml Röhrchen mit entsprechendem Medium gefüllt und im Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt. Die eingefrorenen Zellen wurden ebenfalls im Wasserbad schnell aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in das 15 ml Röhrchen überführt und für 3 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Um sämtliches DMSO zu entfernen, wurde der Überstand verworfen und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in ein steriles Zellkulturgefäß überführt. Am nächsten Tag erfolgte stets ein Mediumwechsel.

4.1.6 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Neubauer improved-Hämozytometer benutzt. Hierfür wurden 9 μl einer entsprechend verdünnten Zellsuspension seitlich in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Inversmikroskop konnten dann 4 Großquadrate ausgezählt werden. Deren gemittelter Zahlenwert ergab, aufgrund des Rauminhaltes von $0,1\text{ mm}^3$ pro Großquadrat, mit 10^4 multipliziert die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

4.1.7 HERSTELLUNG VON KONDITIONIERTEM MEDIUM

Zur Herstellung des konditionierten Mediums wurden 5 Mio. HEK-APP Zellen bzw. HEK293 Zellen in 10 cm Platten ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Weitere 24 h später konnte das angereicherte, konditionierte Medium abgenommen werden. Nach einem Zentrifugationsschritt (3 min, 200 x g) zur Entfernung von Zellen und Zelldebris, wurde das konditionierte Medium mit frischem Medium 1:1 versetzt und für die Präinkubation benutzt. Um mögliche Degradationseffekte von sAPP α zu vermeiden, wurde das konditionierte Medium nur am Tag der Produktion für die Präinkubation der Zellen eingesetzt.

4.1.8 PRÄPARATION UND KULTIVIERUNG HIPPOCAMPALER NEURONEN

Tiere: Trächtige Wistar-Ratten wurden von Harlan (Harlan Winkelmann, Borcheln) bezogen. Die Pflege der Tiere erfolgte unter der Aufsicht der Zentralen Forschungs-Einrichtung (ZFE) der Universitätsklinik Frankfurt am Main. Die Haltung der Tiere und die Tötungsversuche entsprachen der derzeit gültigen gesetzlichen Regelungen in der Bundesrepublik Deutschland.

Die Präparation der hippocampalen Neuronen erfolgte aus neonatalen (P0-P2) Wistar Unilever Ratten nach Krohn et al. (Krohn et al., 1998; Prehn et al., 1993). Zur Isolierung der Zellen wurden die Ratten dekapitiert, die Gehirne entnommen und in 4 °C temperierter Präparationslösung 1 zwischengelagert.

Die entnommenen Gehirne wurden vom Hirnstamm befreit und anschließend die beiden Hemisphären mit dem Skalpellschaber voneinander getrennt. Durch Entfernen des Thalamus wurden die Hippocampi freigelegt und konnten dann herausgeschnitten werden. Nach Entfernen der Gefäßreste wurden die Hippocampi in einem 15 ml Röhrchen mit Präparationslösung 1 gesammelt.

Nach beendeter Präparation wurden die Hippocampi vorsichtig in ein 15 ml Röhrchen mit Präparationslösung 2 überführt und für 20-30 min unter regelmäßigem Aufschütteln im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Diese Inkubation mit Papain löst den Zellverband und ermöglicht die spätere Herstellung von dissoziierten Neuronenkulturen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde Lösung 2 abgenommen und das Sediment mit Präparationslösung 3 vorsichtig resuspendiert. Zum Absetzen von undissoziierten Geweberesten wurde die Zellsuspension ca. 2 min stehen gelassen. Anschließend konnte der Überstand in das 15 ml Röhrchen mit der verbliebenen Präparationslösung 3 überführt werden. Dieser Schritt wurde

zweimal wiederholt, wobei anstelle Lösung 3 durch MEM II ersetzt wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 min bei 600 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in frischem MEM II aufgenommen. Die Zellen wurden in, mit Poly-D-Lysin beschichteten Platten, ausgesät. Am ersten und zweiten Tag nach der Präparation erfolgte ein Mediumwechsel, wobei MEM II mit den unten aufgeführten Supplementen und 1 mM Cytosine β -D-Arabinofuranosidase (CAF) supplementiert, verwendet wurde. Bei CAF handelt es sich um ein Zytostatikum, welches die Proliferation und das Wachstum glialer Zellen supprimiert. Die Experimente wurden an 10 - 12 Tage alten Kulturen durchgeführt, bei denen während dieser Zeit kein Mediumwechsel erfolgte.

TABELLE 4.1: Zusammensetzung MEM II.

MEM II	
50 x MEM	50 ml
Nu-Serum IV	50 ml
45%ige D-Glucose	5,5 ml
4,4%ige NaHCO ₃ -Lösung	25 ml
Glutamax (1,2 mM)	5 ml
(aufgefüllt auf 500 ml mit Aqua ad iniectabilia)	

Kurz vor Gebrauch wurden B27-Supplement (1:50), Penicillin/Streptomycin (1:500) und Gentamicin (1:100) zugegeben.

verwendete Lösungen:

Präparationslösung 1:	150 ml DMEM + 30 mg BSA Fraktion V
Präparationslösung 2:	30 ml Lösung 1 + 30 mg Papain
Präparationslösung 3:	50 ml MEM II + 500 mg BSA Fraktion V + 500 mg Trypsin-Inhibitor, Type II-0 Hühnereiweiß

Alle Präparationslösungen wurden durch einen 0,2 μ m Filter sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei - 20 °C gelagert. Das Kulturmedium (MEM II) wurde mittels einer sterilen Vakuum-Einheit filtriert und für maximal 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Vor Verwendung wurden MEM II und Präparationslösung 2 und 3 im Wasserbad bei 37 °C vorgewärmt. Präparationslösung 2 wurde aufgetaut und auf Eis kaltgestellt.

4.2 ZYTOTOXISCHE STRESS- UND APOPTOSE-STIMULI

Thapsigargin, Epoxomicin, Staurosporin & UV-Strahlung

Die Induktion der Apoptose erfolgte über eine Behandlung der Zellkulturen mit Thapsigargin, einem Inhibitor der sarko- und endoplasmatischen Kalzium-ATPasen. Die dadurch erhöhte Freisetzung an Kalzium aus dem sarko- bzw. endoplasmatischen Retikulum, erhöhte seinerseits die intrazelluläre Kalzium-Konzentration, welche eine Aktivierung der Kalzium-abhängigen Caspasen nach sich zieht. Die dadurch induzierte Caspase-abhängige Apoptose (Thastrup et al., 1989) konnte direkt über den enzymatischen Caspase-Assay beobachtet und quantifiziert werden.

Durch Verwendung von Epoxomicin wurde proteasomaler Stress induziert, welcher zur Verminderung der Degradation von fehlgefalteten Proteinen führt, welches wiederum oxidativen Stress erhöht. Epoxomicin stellt einen potenten Inhibitor dar, der die proteolytischen Zentren des 20S-Proteasoms irreversibel inhibiert (Meng et al., 1999).

Als klassischer Apoptosestimulus wurde UV-Bestrahlung als Positivkontrolle für verschiedene experimentelle Ansätze verwendet. Hierbei wurden die Zellen mit einer Dosis von 100J/m^2 bestrahlt. Als weitere Positivkontrolle wurde Staurosporin (STS), ein potenter Kinaseinhibitor verwendet. STS induziert die klassische Form der Apoptose ebenfalls durch Aktivierung des mitochondrialen Signalweges und bewirkt somit die Aktivierung von Caspasen (Bertrand et al., 1994).

NMDA-Schädigung an hippocampalen Neuronenkulturen

Das Modell der NMDA-Schädigung wurde auf Grund der Korrelation der erhöhten Freisetzung des exzitotoxischen Neurotransmitters Glutamat, durch Bindung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) an Glutamatrezeptoren, mit nachfolgendem toxischem Kalziumeinstrom, gewählt. Eine Störung der Kalziumhomöostase in neuronalen Zellen steht in engem Zusammenhang mit Alterserscheinungen des Gehirns (Toescu et al., 2004) und der Pathophysiologie von Morbus Alzheimer.

Für die NMDA-Schädigung wurden dissoziierte hippocampale Neuronenkulturen, die 10-12 Tage *in vitro* kultiviert wurden, verwendet. Vor Applikation der NMDA-haltigen HBS-Lösung bzw. der SHAM-Kontrolllösung wurde der Zellrasen mit HBS-MgCl gewaschen. Hierbei

wurde das Kultivierungsmedium nicht verworfen, sondern gesondert aufbewahrt, damit es nach Abschluss der Behandlung wieder auf die Neuronenkulturen gegeben werden konnte. Für die Behandlung wurden 300 μ M NMDA-haltige Lösung bzw. SHAM-Kontrolllösung pro Kavität appliziert. Nach genau 5 min wurde die Lösung wieder abgenommen und der Zellrasen vorsichtig zweimal mit HBS-MgCl gewaschen. Anschließend konnte das Kulturmedium auf die Zellen retransferiert werden. Die Behandlungspuffer enthielten neben Glycin, welches als Kofaktor an dem NMDA-Rezeptor agiert, auch Tetrodotoxin, welches als Na⁺-Kanalblocker spontane neuronale Aktivität und die Bildung von Superoxidradikalen verhindern soll (Sengpiel et al., 1998).

TABELLE 4.2: Zusammensetzung des HBS-Puffers.

HBS-Puffer	
NaCl	144 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂	2 mM
KCl	5 mM
D-Glucose	10 m
(320 mOsm, pH 7,4)	

Die HBS-Lösung wurde zum Ansetzen der NMDA-Schädigungslösung und der SHAM-Kontrolllösung mit 1 μ M Glycin und 0,5 μ M Tetrodotoxin versetzt. Der für die einzelnen Waschschrte benötigte HBS-MgCl-Puffer wurde durch Zugabe von 2 mM MgCl zur HBS-Lösung hergestellt.

Die Auswertung des Schädigungspotentials der NMDA-Behandlung erfolgte lichtmikroskopisch nach Trypanblau-Färbung (vgl. 4.3.3) oder durch Analyse der Regulation von sogenannten Stressgenen auf Proteinebene durch Western Blot.

4.3 NACHWEIS VON APOPTOSE

4.3.1 CASPASE-3 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG (CASPASE-ASSAY)

Die Induktion der klassischen Apoptose (Caspase-abhängiger Zelltod) führt zur Aktivierung von Effektor-Caspasen. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Cysteinproteasen, die als inaktive Proenzyme in der Zelle synthetisiert werden. Mit Hilfe eines Caspase-Assays kann die Aktivität der Effektor-Caspasen quantitativ bestimmt werden, welche als Korrelat des Ausmaßes der Apoptose-Induktion in Antwort auf die, im Rahmen der Arbeit verwendeten, Stimuli diene.

Hierfür wurden die Zellen in einer 24-Lochplatte ausgesät und mit den entsprechenden Stimuli behandelt. Jede Behandlung wurde in Quadruplikaten angesetzt. Zur Lyse der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann durch direkte Zugabe von 200 µl Lysepuffer pro Vertiefung auf der Platte lysiert. Generell erfolgten dann eine Abdichtung der Platte mittels Parafilm und eine Lagerung über Nacht bei -20 °C, um die Effektivität der Lysierung zu erhöhen. Die Caspase-Aktivität wurde mit dem Proteingehalt korreliert. Dafür wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Die Vermessung der Enzymaktivität erfolgte nach Zugabe von 150 µl Reaktionspuffer auf 50 µl Lysat über 2 h bei 37 °C in einem Multiplate-Reader (Tecan, Genios), wobei in 10 minütigen Abständen die Fluoreszenz vermessen wurde. Die Fluoreszenz resultierte aus der Spaltung des im Reaktionspuffer eingesetzten DEVD-AMC als Substrat mit einer Caspase-spezifischen Spaltstelle. Das Substrat (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin, Bachem, Heidelberg) besteht aus einem Tetrapeptid (DEVD) und einem daran gekoppelten Fluorophor AMC (Aminomethylcoumarin). Das durch Caspasespaltung freigesetzte Aminomethylcoumarin kann fluorimetrisch nach Anregung bei 360 nm bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm vermessen werden. Die DEVD Sequenz wird präferentiell von Caspase-3 ähnlichen Caspasen (wie -3, -7 und -6) gespalten. Zur Auswertung der Daten wurde die Absorption als Funktion der Substratumsetzung gegen die Zeit in einem Diagramm aufgetragen. Die Caspase-3-Aktivität entsprach dem Anstieg dieser Kurve im linearen Bereich.

TABELLE 4.3: Für Caspase-Assay verwendete Lösungen.

Lysepuffer		Reaktionspuffer	
HEPES pH 7,4	10 mM	HEPES pH 7,5	25 mM
CHAPS	0,5%	EDTA	1 mM
KCl	42 mM	Sucrose	10%
MgCl ₂	5 mM	CHAPS	0,1%
EDTA	0,1 mM		
EGTA	0,1 mM	<i>frisch hinzufügen</i>	
		DTT	3 mM
<i>frisch hinzufügen</i>		DEVD-AMC	10 µM
DTT	1 mM		
Aprotinin	5 µg/ml		
Leupeptin	1 µg/ml		
Pepstatin A	1 µg/ml		
PMSF	1 mM		

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration der Proteinlösung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde parallel zum Caspase-Assay durchgeführt. Sie beruht auf dem Prinzip, dass sich bei der Anlagerung vom Farbstoff Coomassie Brilliant Blau an Protein dessen Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Hierfür wurde ebenfalls eine Standardreihe mit BSA in 0,9% NaCl pipettiert. Als Leerwert diente der Lysepuffer. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 25 µl Zelllysat, 25 µl 0,9% NaCl und 200 µl Rotiquant (Bradford-Reagenz) pipettiert. Nach einer 5minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die photometrische Vermessung. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Standardreihe.

verwendete Lösungen:

0,9% NaCl

Rotiquant

4.3.2 FÄRBUNG PROPIDIUMIODID UND HOECHST

Eine weitere Möglichkeit Zelltod zu quantifizieren besteht *in vitro* in der Färbung der Zellen mittels Propidiumiodid (PI) und Hoechst, gefolgt von einer lichtmikroskopischen Bewertung der angefärbten Bestandteile. Hierbei kann der Farbstoff PI durch die perforierte Zellmembran in die Zelle eindringen und in die DNA spät-apoptotischer und nekrotischer Zellen interkalieren. Zellen mit intakter Membran bleiben ungefärbt. Die Färbung mit Hoechst lässt morphologische Veränderungen des Nukleus erkennen. So werden nach 10minütiger Inkubation alle Zellkerne gefärbt und entsprechend fragmentierte / kondensierte Zellkerne gegenüber intakten quantifiziert. Die Farbstoffe Hoechst und PI wurden in einer finalen Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt. Die Inkubation erfolgte vor Licht geschützt im Brutschrank.

4.3.3 TRYPANBLAU-FÄRBUNG

Die Trypanblau-Färbung ist eine Ausschlussfärbung, da der Farbstoff selektiv in Zellen mit poröser Membran eindringt. Dort bindet das Anion des Azofarbstoffes an Proteine und bewirkt eine tiefblaue zytoplasmatische Färbung.

Zur Färbung der dissoziierten hippocampalen Neurone wurden diese nach Behandlungsende zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min Trypanblaulösung im Brutschrank inkubiert. Auf Grund der Toxizität von Trypanblau wurde die Lösung dann entfernt und erneut mit PBS zweimal gewaschen. Anschließend wurden die Neuronenkulturen mit PFA-Lösung überschichtet und so für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach Abschluss der Fixierung wurde mit PBS dreimal gewaschen, wobei das PBS im dritten Waschschrift zum Überschichten auf den Zellen belassen wurde. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Auszählung der Trypanblau-positiven Zellen gegen die ungefärbten Zellen.

verwendete Lösungen: 1M PBS

0,1 % Trypanblau in PBS

TABELLE 4.4: Zusammensetzung des Fixativs.

Fixativ	
PFA	4 g
NaOH	1-2 Tropfen
10 x PBS	10 ml
Sucrose	4 g
ddH ₂ O	auf 100 ml auffüllen
(pH 7,4 einstellen)	

4.4 ANALYSE VON PROTEINEN

4.4.1 HERSTELLUNG VON GESAMTZELLEXTRAKTEN

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde das Medium von den Zellkulturen entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 2 x SDS-Lysepuffer lysiert. Das Volumen des Lysepuffers richtete sich nach Anzahl der zu lysierenden Zellen. So wurden für ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen 50 µl eingesetzt. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Zellen mittels Zellschaber von der Oberfläche der Zellkulturgefäße gekratzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, sonifiziert und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Erfolgte die Analyse der Proteine via Western Blot zu einem späteren Zeitpunkt, konnten die Gesamtzellextrakte bei -20 °C aufbewahrt werden.

TABELLE 4.5: Zusammensetzung des 2x-SDS-Lysepuffers.

Lysepuffer	
SDS	2% (w/v)
Tris/HCL (pH 7,5)	68,5 mM
Glycerin	10%
<i>frisch hinzugeben</i>	
Proteinase-Inhibitor	1 mM
Phosphatase-Inhibitor	1 mM

4.4.2 PROTEINGEHALTSBESTIMMUNG VON GESAMTZELLEXTRAKTEN

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Gesamtzellextrakten wurde mit dem BCA-Protein Assay Kit (Pierce, Perbio Science, Bonn) vorgenommen. Die Proteinbestimmung erfolgte generell in einer Doppelbestimmung. Über einen BSA-Standard lässt sich proportional die Proteinkonzentration im Gesamtzellextrakt bestimmen. Als Leerwert diente der Lysepuffer. Für die Proteinbestimmung wurden 3 µl Lysat und 150 µl BCA (*bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure) eingesetzt. Eine Inkubation von 30-60 min bei 37 °C ermöglicht die Reaktion von Proteinen, unter alkalischen Bedingungen Cu^{2+} -Ionen zu komplexieren und zu reduzieren. Durch Zusatz von Bicinchoninsäure (2,2'-bichinolin-4,4'-dicarbonsäure-Dinatriumsalz) wurde Cu^+ komplexiert, was mit einer Farbentwicklung bei einem Absorptionsmaximum von 560 nm einherging, welche anschließend photometrisch vermessen wurde.

4.4.3 DISKONTINUIERLICHE SDS-PAGE

Bei der eindimensionalen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli werden die Proteine in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Durch den Zusatz von SDS wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. So besitzt das Polypeptid ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse und die elektrophoretische Beweglichkeit hängt allein von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels ab. Bei der Vorbereitung der Lysate wurden diese mit SDS im Lysepuffer und DTT versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Dies bewirkte die Solubilisierung und Denaturierung der Proteine und die Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten. Bei der diskontinuierlichen SDS-Page werden zwei Gele (Trenn- und Sammelgel), die sich in ihrer Acrylamidkonzentration und ihrem pH-Wert unterscheiden, übereinander geschichtet.

Zuerst passiert die Probe das Sammelgel mit großer Porenweite (geringe Polyacrylamidkonzentration), in dem die Probe in einer schmalen Bande konzentriert wird, und tritt dann in das Trenngel mit weitaus geringerer Porenweite (hohe Polyacrylamidkonzentration) ein. Durch die Unterschiede in der Porengröße entsteht eine sogenannte „Gelgrenze“, welche ein reproduzierbares Auftrennen der Proteine im Trenngel gewährleistet. Die Polymerisierung der Gele erfolgt ausgehend von Acrylamid (Monomer)

und Bisacrylamid (bifunktional) und wird durch Zugabe von 1/2000 TEMED (Katalysator) und 1/100 APS (Ammoniumperoxidsulfat, Quervernetzer) gestartet. Vor dem Auftragen der Lysate wurden diese mit 1/6 Ladepuffer versetzt.

In dieser Arbeit wurden 8-12%ige Trenngele mit einer Stärke von 1 mm verwendet. Für die Elektrophorese wurden die Gele in der Kammer eingespannt und diese mit Westernelektrophoresepuffer (WEP) gefüllt. Während des Laufs im Sammelgel wurde eine konstante Spannung von 90 V angelegt, währenddessen mit Eintritt der Lauffront ins Trenngel die Spannung auf 160 V erhöht wurde.

Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (vgl. 4.4.4), wurde das Gel mit Simply Blue Safe Stain (Invitrogen, Karlsruhe) für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken gefärbt. Diese Coomassie-Färbung ermöglicht eine optische Kontrolle des Gellaufs und des Transfers, durch das Anfärben von nicht-transferiertem Protein im Gel. Durch Waschen der gefärbten Gele mit VE-Wasser wird der ungebundene Farbstoff aus dem Gel entfernt und nur das Bandenmuster der Proteine sichtbar. Nach dem Entfärben kann das Gel auf ein Whatman-Papier transferiert, mit Seranfolie bedeckt bei 60 °C für 2 h unter Vakuum auf dem Geltrockner (Biorad, München) getrocknet werden.

TABELLE 4.6: Zusammensetzung 6x-Ladepuffer.

6x-Ladepuffer	
Tris/HCl (pH 6,8)	250 mM
Glycerin	30%
SDS	10%
DTT	600 mM
Bromphenol-Blau	0,2%

TABELLE 4.7: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.

Sammelgel		Trenngel	
PAA (37,5:1)	5%	PAA (37,5:1)	8%-15%
Tris/HCl (pH 6,8)	120 mM	Tris/HCl (pH 8,8)	375 mM
SDS	0,1%	SDS	0,1%
APS	0,1%	APS	0,1%
TEMED	0,05%	TEMED	0,05%

TABELLE 4.8: Zusammensetzung des WEP.

Westernelektrophoresepuffer (WEP)	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	25 mM

4.4.4 WESTERN BLOT

Der Transfer von Proteinen auf eine Membran bezeichnet man als Western Blot. Der in dieser Arbeit verwendete semi-dry Blot ist ein elektrophoretisches Verfahren, bei dem senkrecht zum Gellauf die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. Hierfür wurden Whatman-Papiere und Gel vorher 15 min in eiskaltem Transferpuffer äquilibriert. Dann wurden nacheinander auf der Anodenplatte des Blotters Whatman-Papier, Membran und Gel aufgeschichtet. Den Abschluss zur Kathodenplatte bildete ein weiteres Whatman-Papier. Der Transfer erfolgte bei konstanter Stromstärke von 70 mA pro Gel und max. 25 V für 60 min.

TABELLE 4.9: Zusammensetzung des Transferpuffers.

Transferpuffer	
Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	10% - 20%

4.4.5 IMMUNDETEKTION

Vor der Antikörper-Reaktion wurde die Membran eine Stunde mit einer 5%igen Milchpulver-TBS- $T_{0,05\%}$ -Lösung geblockt. Dabei wurden unspezifische Bindungen an der Nitrozellulose-Membran abgesättigt, um eine spezifische Bindung des Primär-Antikörpers an sein Antigen zu ermöglichen. Dies geschah bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Bei der Detektion von phosphorylierten Proteinen wurde der Primär-Antikörper in einer 1:500 Verdünnung in 5%iger BSA-TBS- $T_{0,05\%}$ -Lösung angesetzt und über Nacht mit der Membran bei 4 °C hybridisiert. Für unphosphorylierte Proteine wurde der Primär-Antikörper in 3%iger Milchpulver-TBS- $T_{0,05\%}$ -Lösung unter gleichen Bedingungen mit der Membran inkubiert. Nach

dreimaligen Waschen mit TBS-T_{0,05%} für 5 min konnte die Membran mit einem entsprechendem Sekundär-Antikörper für 1 h unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert werden. Der Sekundär-Antikörper wurde nach Herstellerangaben 1:20.000 verdünnt eingesetzt. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBS-T_{0,05%} erfolgte die Detektion mit dem Odyssee Infrared Imaging System (LI-COR, USA). Hierbei wurden Sekundär-Antikörper verwendet, die mit einem Infrarot-Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt sind. Somit konnte die Emission bei der spezifischen Exzitationswellenlänge vermessen und die Intensität der Banden quantifiziert werden.

verwendete Lösungen:

Blockierlösung: 3% - 5% (w/v) Milchpulver oder BSA in TBS-T_{0,05%}

TABELLE 4.10: Zusammensetzung TBS-T_{0,05%}.

TBS-T _{0,05%}	
Tris (pH 7,5)	50 mM
NaCl	150 mM
Tween	0,05%

4.4.6 ENTFERNEN VON ANTIKÖRPERN („STRIPPING“)

Bei serieller Verwendung von verschiedenen Antikörpern auf einer Membran hat es sich als sinnvoll herausgestellt, die Membran von den zuvor gebundenen Antikörpern zu befreien. Hierfür wurde die Membran jeweils 15 min nacheinander mit HCL, PBS, NaOH und abschließend erneut mit PBS gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit Blockierlösung konnte die Membran wieder mit einem weiteren Primär-Antikörper inkubiert werden.

verwendete Lösungen:

0,01 M HCl

0,01 M NaOH

Blockierlösung (vgl.4.4.5)

4.5 NUKLEINSÄUREARBEITSTECHNIKEN

4.5.1 ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA

Da RNA im Vergleich zu DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse ist, müssen besondere Vorkehrungen beim Arbeiten mit RNA getroffen werden. Um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden, wurden die benötigten Materialien vorher mit einer Dekontaminations-Lösung (RNaseZapR) gereinigt. Zur Isolierung der gesamten RNA wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturgefäße abtrypsiniert, in Vollmedium aufgenommen und bei 200 g sedimentiert. Nachdem das Pellet zweimal mit PBS gewaschen wurde, erfolgte die Isolierung der RNA mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers. Um unerwünschte genomische DNA von der isolierten RNA zu trennen wurde eine Hydrolyse mit DNase I in die Isolationsvorschrift integriert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte UV-photometrisch bei 260 nm. Die Reinheit der Präparationen wurde durch das Verhältnis A260/A280 bestimmt, welches zwischen 1,8 - 2,0 liegen sollte. Bei der UV-photometrischen Konzentrationsbestimmung entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 etwa 40 µg RNA pro ml.

4.5.2 REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA (RT-PCR)

Die cDNA- Erststrangsynthese erfolgte mit der „Superscript III“- Reversen Transkriptase von Invitrogen. Als Matrize der Synthese diente die vorher isolierte Gesamt-RNA. Für einen Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden zunächst 1 µg RNA mit 1 µl oligo-(dT)-Primer (=250 ng/µl), 1 µl random primer (=200 ng/µl) und 1 µl dNTPs (=500 nM) auf ein Volumen von 14 µl mit Wasser aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Daraufhin wurden 4 µl 5x-First strand buffer und 1 µl DTT (= 5 mM) hinzugegeben. Nach weiterer zweiminütiger Inkubation bei 40 °C wurde die Reverse Transkriptase SuperScript III dem Ansatz hinzugefügt und folgendes Programm für die cDNA-Synthese in der PCR-Maschine nachgeschaltet:

5 min	→	25 °C
5 min	→	30 °C
5 min	→	35 °C
50 min	→	40 °C
15 min	→	70 °C

4.5.3 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) basiert auf der herkömmlichen Amplifizierung von DNA durch eine PCR, nur dass hierbei die Quantität der Ziel-mRNA, bzw. deren cDNA, nach jedem Durchgang in Echtzeit gemessen wird. Ein Ansatz für die qPCR bestand aus: 25 ng cDNA, 1xTaqMan Gen Expression Assay für das Zielgen und 1x FastStart Universal Probe Master-Mix. Das PCR-Programm beginnt mit zehninütigem Erhitzen auf 95 °C, bei der die FastStart Taq-DNA-Polymerase aktiviert wird, anschließend beginnt die Amplifizierung (15 sec bei 95 °C) und Quantifizierung (60 sec bei 60 °C), welche vierzigmal wiederholt wird. Für die Quantitätsmessung wurde in dieser Arbeit eine TaqMan-Sonde verwendet, an deren einem Ende sich ein Quencher und an dem anderen ein Fluoreszenz-Reporter (6-FAM-phosphoramidit) befindet. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase wird während der Synthese des komplementären Strangs die Sonde abgebaut, der Quencher (Q) und der Reporter (R) werden räumlich getrennt und dadurch die Fluoreszenz des Reporters verstärkt. Bei der Auswertung wurde die Fluoreszenzstärke mit einem Referenzwert, in dieser Arbeit die Amplifizierung des Gens „TATA-Box Binding Protein“ (TBP), normiert.

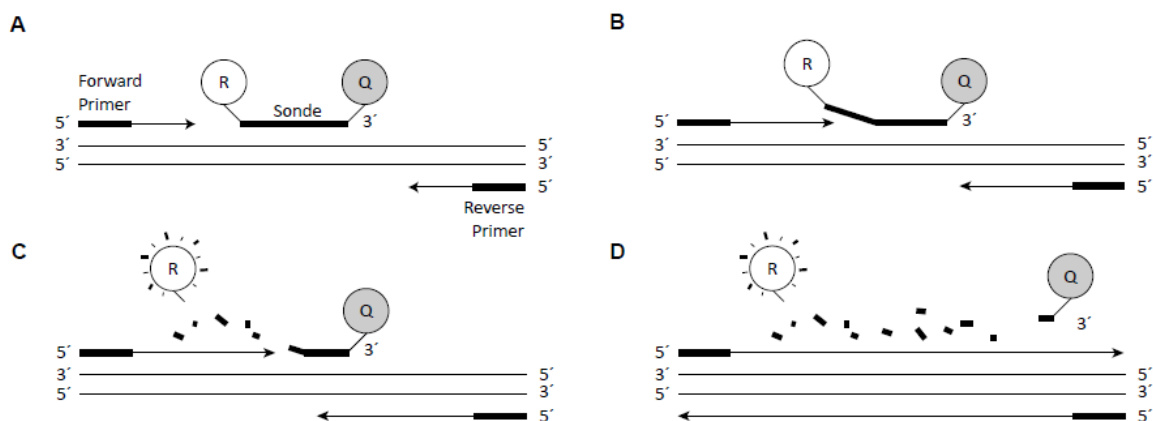


ABBILDUNG 4-1: Prinzip der TaqMan-PCR. (A) Zu Beginn binden Primer und Sonde an die cDNA. (B) Durch fortschreitende Amplifikation wird die Sonde zunehmend verdrängt. (C) Während der Synthese des komplementären Strangs wird durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerase die Sonde abgebaut. (D) Der Abbau der Sonde trennt Reporter und Quencher räumlich voneinander, was in einer Aktivierung der Fluoreszenz resultiert.

4.6 ELISA

Zur Quantifizierung des sezernierten sAPP α im konditionierten Medium der HEK293 und HEK-APPwt Zellen wurde ein für sAPP α spezifischer enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (Engvall and Perlmann, 1971) (IBL, America) nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Festphasen Sandwich-ELISA. Dabei wird zuerst mit einem Primärantikörper der gegen sAPP α gerichtet ist über Nacht inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die das Chromogen TMB (Tetra-Methyl-Benzidin) unter Bildung eines blauen Farbstoffes umsetzt. Durch Zusatz von Schwefelsäure wird diese Farbreaktion gestoppt und ein stabiler gelber Farbkomplex entsteht. Die Farbintensität kann photometrisch vermessen werden, wobei diese proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Proteins ist, welche anhand eines mitgelieferten internen sAPP α -Standards kalkuliert werden kann.

4.7 MTT

Das gelbe wasserlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird in lebenden Zellen durch membrangebundene, mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen am Tetrazolring enzymatisch gespalten und zu wasserunlöslichem Formazan reduziert (Slater, 1963; Vistica et al., 1991) (vgl. Abbildung 4-2).

Die Succinat-Dehydrogenase ist ein mitochondriales Enzym des Zitratzyklus, welches die Umwandlung von Succinat zu Fumarat unter Beteiligung der Kofaktoren NADH und NADPH katalysiert

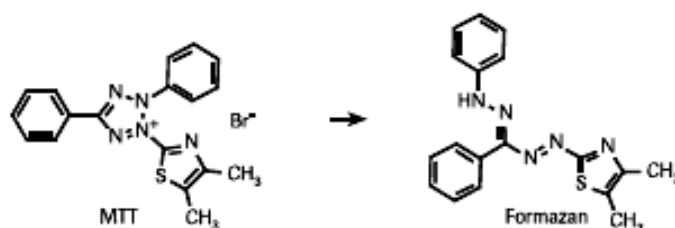


ABBILDUNG 4-2: Reduktion von MTT zu Formazan.

Zur Durchführung des MTT-Assays wurden die Zellen mit 20 µl MTT-Reagenz für 3 h im Brutschrank inkubiert. Dies entsprach einer finalen Konzentration von 0,83 µg/µl MTT. Anschließend wurde das Medium verworfen und das entstandene Formazan mit Isopropanol/HCl solubilisiert. Durch 20minütiges Schütteln auf dem Taumelschüttler wurde die Lösung homogenisiert und konnte dann bei 560 nm photometrisch vermessen werden.

verwendete Lösungen: MTT-Reagenz (5 mg/ml in PBS)

40 mM HCl in Isopropanol

4.8 HERSTELLUNG VON LIPOSOMEN

Für die Membran-Inkorporation von Omega-3 Fettsäuren werden Transfer-Liposomen, sogenannte SUV (*small unilammelar vesicles*), benötigt. Aufgrund des hohen Krümmungsradius und den dadurch bedingten Membranspannungen weisen SUV eine vergleichsweise starke Tendenz zur Fusion und eine erhöhte Permeabilität für niedermolekulare Stoffe auf (Hashimoto et al., 2006a).

Diese ermöglichen einen stöchiometrischen Transfer von liposomalen Omega-3 Fettsäuren in die nativen Membranen, indem ihr Matrixlipid mit dem Bilayer interferiert. Als Matrixlipid dient Lipoid S100 (Phosphatidylcholin aus fettfreiem Sojalecithin, Fa. Lipoid, Ludwigshafen). Bei der Herstellung der Liposomen wird die Filmbildungsmethode in Anlehnung an (Igbavboa et al., 1996) verwendet.

Zunächst wurden in Ethanol (+ 0,05% Butylhydroxytoluol) 5 mmol/l der Fettsäuren und in Dichlormethan gelöstes Lipoid S100 (1,7 mg/ml) in einem Rundkolben (100 ml) im Verhältnis 37/63 mol% für Docosahexaensäure (DHA) und Docosansäure (DA) gemischt (Mayol et al., 1999). Gleichzeitig wurde eine Kontrollpräparation ohne Omega-3-Fettsäure hergestellt. Die Mischung wurde anschließend unter Schutzgas (Argon) bei maximal 40 °C und vermindertem Druck einrotiert und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Der durch die Lösungsmittlevaporation entstandene, trockene Lipidfilm wurde mit 5 ml Aqua dest. und ca. 5 g Glasperlen versetzt, für eine Minute in der Hand geschwenkt, und dann für eine Minute im Ultraschallbad (Typ Sonorex RK 105H, Firma Bandelin) bei Raumtemperatur beschallt. Zur Anreicherung der Lösung mit MLV (*multilammelar vesicles*) wurden diese beiden Schritte zweimal wiederholt. Zur Erzeugung von SUVs wurde die Dispersion, in ein dickwandiges Polypropylen-Röhrchen gefüllt, mit einem Branson-Sonifier (Typ Cell disruptor B15, Firma Branson Ultrasonics Corp.) für 45 min bei 4 °C unter Schutzgas beschallt (Output 3 = 25-

28% Leistung, duty cycle 40%). Die klare Lösung wurde abschließend bei 8.000 g und 4 °C für 10 min in der Zentrifuge (Modell J2, Rotor JA-20.1, Firma Beckman) zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt wurde eine Trennung zwischen schwereren MLV und leichteren SUV erreicht. So dass die SUVs als Überstand (3-4 ml) abgenommen werden konnte. Die SUV-Präparation wurde unter Stickstoff bei Raumtemperatur im Dunkeln für maximal 5 Tage gelagert und vor Benutzung über einen 0,22 µm Sterilfilter filtriert.

TABELLE 4.11: Zusammensetzung der Liposomenlösung.

Liposomenlösung	
Lipoid S100	42 mM
BHT	0,05%
DHA oder DA	5 mmol

4.9 ANISOTROPIE-MESSUNG VON HEK-APP ZELLEN

Die Analyse der Anistropie-Messung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Gunter Eckert (Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe-Universität Frankfurt) und wurde wie in der Publikation von Eckert et al. 2011 beschrieben, angefertigt.

4.10 HERSTELLUNG UND AUFREINIGUNG VON 6xHis-sAPP α AUS *PICHIA PASTORIS*

Für die Aufreinigung von sAPP α aus Hefe wurde ein mit dem Vektor pBLHIS-SX-sAPP695 α transformierter *Pichia pastoris* GS115 Hefestamm verwendet. Der hier verwendete Vektor (vgl. Abbildung 4-3) beinhaltet unter anderem eine „ α -Mating Factor Signaling“ Sequenz, die den stabil transformierten Hefen die Sekretion von sAPP α in den Kulturüberstand ermöglichen. Der verwendete GS115 Stamm ist Histidin auxotroph (*his4*), d.h. er kann nur auf Histidin-haltigem Medium wachsen, da er nicht in der Lage ist dieses selbst zu produzieren. His4 dient hier als Marker für *P. pastoris*, da die Laborstämme nach Integration des Expressionsvektors ins Genom, prototroph für Histidin werden (Cereghino and Cregg, 2000). Eine Besonderheit bei der Expression stellt die Mutation der Glykosilierungsstelle zu Alanin dar, die darin resultiert, dass sAPP α unglykosyliert in den Überstand sezerniert wird.

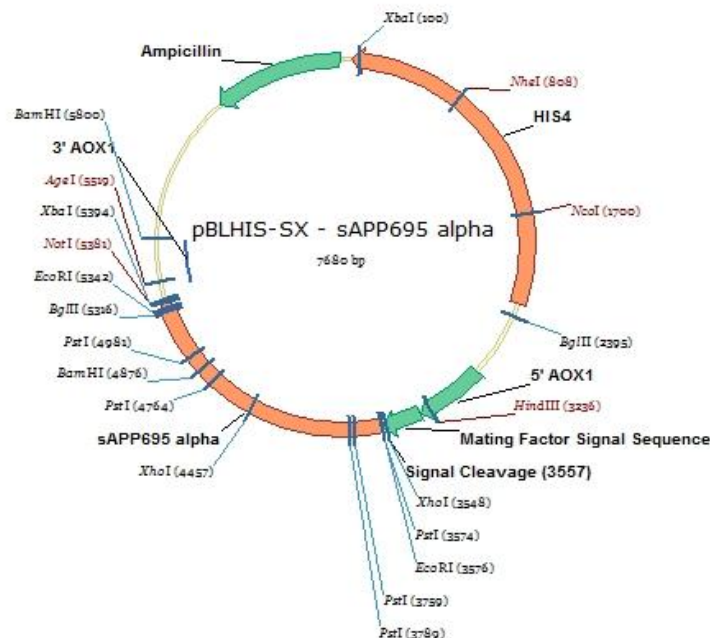


ABBILDUNG 4-3: Vektorkarte von pBLHIS-SX-sAPP695 α . Eingezeichnet sind Restriktionsschnittstellen, Ampicillin-Resistenz-Gen, AOX1-Promotor fusioniert mit α -Mating factor Signal Sequence (aus *S. cerevisiae*), HIS4 (biosynthetischer Marker - His-Tag) und das sAPP695 α -Insert.

Zur Anzucht der Hefesuspension wurde ein Kolben mit BMGY-Medium (*Buffered Glycerol complex Medium*) mit den Hefen aus dem Glycerolstock beimpft. Bei 30 °C wurde eine Schüttelkultur über 2 Tage angelegt. Anschließend wurden die so vermehrten Hefen bei 1.500 x g für 5 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in einem kleinen Volumen BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*) resuspendiert und für einen Tag bei 30 °C als Schüttelkultur inkubiert. Das im BMMY enthaltene Methanol induziert die Expression von sAPP α , währenddessen BMGY-Medium anstelle von Methanol Glycerol besitzt und der Anreicherung an Biomasse dient.

Die Aufreinigung, des in den Überstand sezernierten Proteins, wird durch die Bindung der 6-Histidinreste, mit welchen sAPP α markiert ist, an Ni-Sepharose Beads ermöglicht. Hierbei ist das zweiwertige Ni²⁺ Ion in einem oktaedrischen Komplex mit dem Trägermaterial und H₂O-Molekülen gebunden. Diese können durch Histidin verdrängt werden, wodurch ein sehr stabiler Chelat-Komplex entsteht. Ni²⁺ ist durch Nitrilotriessigsäure-Reste gebunden und kann mit zwei Histidin-Resten des Proteinkonstruktes im Austausch gegen Wasser interagieren.

In Vorbereitung wurden die Ni-Sepharose Beads drei Mal gewaschen. Als erster Waschpuffer diente ddH₂O, für die beiden Weiteren wurde LEW-Puffer verwendet. Die einzelnen Waschschrte erfolgten durch 5 min Inkubation der Beads mit dem Waschpuffer

auf dem Überkopfschüttler. Um den Puffer dann zu entfernen, wurden die Beads abzentrifugiert (5 min, 500 x g) und der Waschpuffer verworfen. Nach dem dritten Waschschrift wurden die Beads in einem kleinen Volumen LEW-Puffer resuspendiert und bis zur späteren Verwendung gelagert (maximal 2 h).

Die Hefesuspension wurde für die weitere Bearbeitung auf 50 ml Reaktionsgefäße verteilt und abzentrifugiert (10 min, 500 x g). Der sAPP α -haltige Überstand wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit den Ni-Sepharose-Beads in einem Verhältnis von 4:1 versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht, wobei der His-Tag des Proteinkonstrukts an die zweiwertige Ni²⁺-Kationen bindet. Am nächsten Tag wurde die Suspension abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Beads mit dem gebundenen 6xHis-sAPP α gewaschen. Hierfür wurden die, bei 500 x g für 5 min abzentrifugierten, Beads mit 20 ml LEW-Puffer resuspendiert und auf dem Überkopfschüttler für 10 min gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, so dass eventuell unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine und restliche Bestandteile des BMMY-Mediums entfernt wurden.

Für die nachfolgende Elution des Proteinkonstruktes, wurde der bisher verwendete Waschpuffer LEW mit 500 mM Imidazol versetzt, welches das Histidin des Proteinkonstruktes kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt und so zur Lösung der Bindung zwischen Ni²⁺ und Histidin führt. Auch die Elution erfolgte in 3 Schritten, um die Ausbeute an Protein zu maximieren. Hierfür wurden die Pellets mit 3 ml Elutionspuffer versetzt, 30 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert und bei 500 x g für 5 min sedimentiert. Der resultierende Überstand enthielt das gewünschte Proteinkonstrukt und wurde auf Eis gelagert. Die darauf folgenden Elutionsschritte wurden analog durchgeführt. Die erhaltenen Überstände konnten in einem Reaktionsgefäß vereinigt werden und für die Aufkonzentrierung vorbereitet werden. Die Aufkonzentrierung erfolgte durch Größenausschluss mittels Zentrikon-Röhrchen. Die Röhrchen wurden in Vorbereitung mit LEW-Puffer gewaschen um das Glycerin, welches die Filtermembran bedeckt, zu entfernen. Dafür wurden die Röhrchen mit 10 ml Puffer gefüllt und für 10 min bei maximal 4000 x g zentrifugiert. Der Puffer wurde danach verworfen. Die gewählten Zentrikon-Röhrchen besitzen einen Cut-Off von 10 kD. Zum Aufkonzentrieren wurden die, mit der Proteinlösung gefüllten Röhrchen, solange bei 800 x g zentrifugiert, bis das Endvolumen auf 2,5 ml oder weniger eingengt war. Anschließend wurde ein Pufferaustausch vorgenommen, damit dass im Elutionspuffer enthaltene Imidazol entfernt werden konnte. Die benutzten PD10 Säulen wurden nach Herstellerangaben verwendet und erst mit dem 5fachen Säulenvolumen (25 ml) TRIS/HCl Puffer äquilibriert. Alle Arbeitsschritte der Aufreinigung erfolgten bei 4 °C.

Die erhaltene Proteinlösung wurde mittels BCA quantifiziert (vgl.4.4.2). Eine Überprüfung auf eventuelle Degradationsprodukte geschah über eine gelelektrophoretische Auftrennung und anschließender Coomassie-Färbung (vgl.4.4.3).

In dieser Arbeit wurde für die Berechnung der Stoffmenge des eingesetzten sAPP α der His-Tag vernachlässigt und ein Molekulargewicht von 100.000 angenommen.

TABELLE 4.12. Zusammensetzung von BMGY und BMMY.

BMGY/BMMY	
Hefeextrakt	1%
Pepton	2%
K ₃ PO ₄	100 mM
YNB (<i>yeast nitrogen base</i>)	1,34%
Biotin	0,0004%
Methanol für BMMY	0,5%
Glycerol für BMGY	1%

TABELLE 4.13: Zusammensetzung des LEW-Puffers.

LEW-Puffer	
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
(Einstellen auf pH 8)	

TABELLE 4.14: Zusammensetzung des Äquilibrierungspuffers.

Äquilibrierungspuffer:	
Tris	5 mM
NaCl	150 mM
(Einstellen auf pH 8)	

4.11 DATENANALYSE

Die Analyse der Western Blot Daten erfolgte densitometrisch mit der Odyssey Application Software 2.1 (LI-COR, Lincoln, USA).

Die gezeigten Daten sind, soweit nicht anders vermerkt, mit dem Standardfehler der Mittelwerte (\pm SEM) dargestellt. Statistische Analysen erfolgten mittels SPSS Software, wobei einfaktorielle Anova kombiniert mit dem Posthoc Test Tukey angewendet wurde.

5 ERGEBNISSE

5.1 DIE ROLLE DES SPALTPRODUKTS sAPP α IN DER VERMITTLUNG VON NEUROPROTEKTION UNTER BEDINGUNGEN VON PROTEASOMALEM STRESS

Die sogenannte nicht-amyloidogene Prozessierung von APP resultiert in der Sezernierung von sAPP α unter Ausschluss der Generierung von A β . Diverse Studien geben Hinweise auf eine neurotrophe und neuroprotektive Funktion von sAPP α . So zeigten Mattson und Cheng (Mattson and Cheng, 1993), dass sAPP α in geringen Dosen 1-1000 pM das Langzeitüberleben von kortikalen und hippocampalen Neuronen sichert und darüber hinaus vor metabolischem und oxidativem Stress schützen kann. Diese Befunde lassen sich aber nur für sAPP α , jedoch nicht für sAPP β , was durch β -Sekretase-Spaltung von APP entsteht, sichern. Des Weiteren geben Studien Hinweise auf eine Rolle von sAPP α in Prozessen der neuronalen Plastizität (Ishida et al., 1997), der Erregbarkeit von Neuronen und synaptischer Transmission (Furukawa et al., 1996a). Ferner ist bekannt, dass sAPP α eine stabilisierende Wirkung auf die Kalziumhomöostase unter Stressbedingungen aufweist. In dieser Arbeit sollen die protektiven Mechanismen von sAPP α unter verschiedenen Stressbedingungen in unterschiedlichen Modellen untersucht werden. Des Weiteren soll untersucht werden, ob eine pharmakologische Modulation der APP-Prozessierung mittels Docosahexaensäure einen protektiven Einfluss unter Stressbedingungen ausübt.

5.1.1 CHARAKTERISIERUNG DER APP-ÜBEREXPRIMIERENDEN HEK-ZELLEN

Zur Untersuchung der protektiven Wirkung von sAPP α wurden Überstände von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK, *human embryonic kidney cells*) benutzt. Dafür wurden APP695 überexprimierende Kulturen (HEK-APP) verwendet. Um auszuschließen, dass eventuelle Effekte auf Bestandteile des Mediums oder sezernierte Faktoren der Zelllinien zurückzuführen sind, wurden untransfizierte Zellen (HEK293) als Kontrolle in der Produktion des konditionierten Mediums mitgeführt.

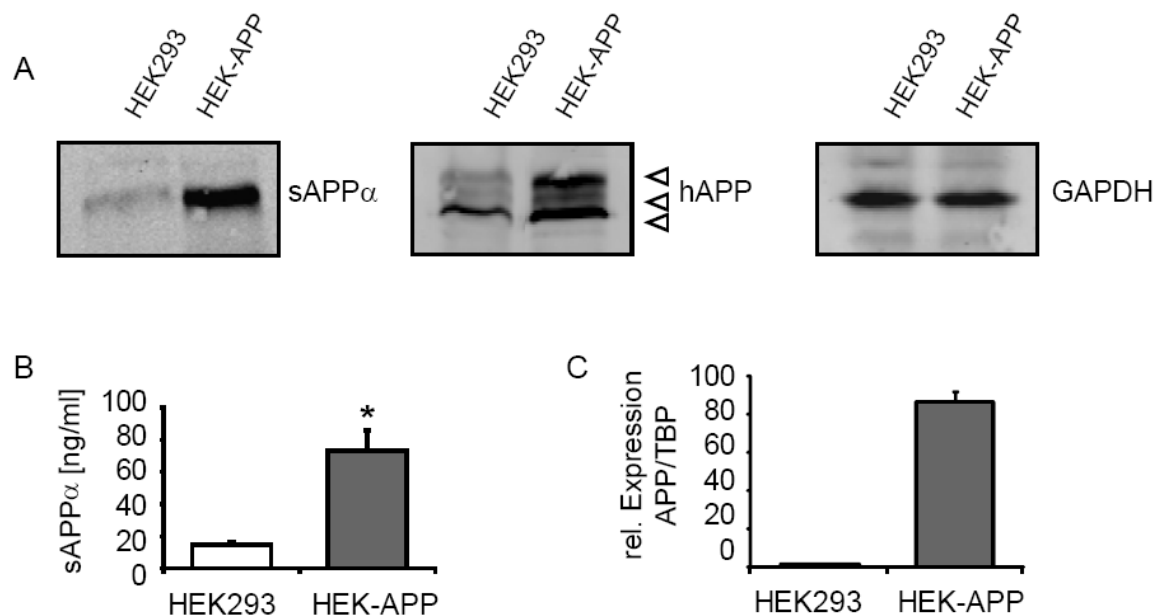


ABBILDUNG 5-1: APP Expression in APP-überexprimierenden HEK Zellen. Für alle Analysen wurden Zellkulturen mit 80%iger Konfluenz ausgesät für einen Tag im Inkubator belassen und 24 h nach einem Mediumwechsel untersucht. Die Überexpression von APP in HEK-APP Zellen wurde im Vergleich zu untransfizierten HEK293 Zellen durch Analysen auf Proteinebene und RNA-Ebene bestätigt. (A) Hohe Mengen an intrazellulärem APP (hAPP) und sezerniertem sAPP α konnten für HEK-APP Zellen im Western Blot nachgewiesen werden. Im Gesamtzelllysate konnten die unreife APP-Form (~110kD), sAPP (~120kD) und die reife APP-Form (~130kD) nachgewiesen werden (gekennzeichnet durch Pfeilspitzen). Als Ladekontrolle wurde GAPDH nachgewiesen. (B) Eine Quantifizierung des sAPP α -Gehaltes im Überstand mittels ELISA korreliert mit der ermittelten Überexpression. (C) Eine Quantifizierung der RNA-Expression für APP wurde in beiden Zelllinien auf TBP (*TATA-box binding protein*) normiert. Zur Ermittlung der relativen APP-Expression wurde zusätzlich auf die APP-Expression der HEK293 Zellen normiert. Für den ELISA wurde beim Mediumwechsel ein Medium ohne Serum verwendet. Für ELISA und TaqMan-Analysen sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 3$ Experimenten gezeigt. (* $p < 0,05$ wurde als signifikant gegenüber der Kontrolle (HEK293) eingestuft)

Zur Charakterisierung der beiden Zelllinien wurde das intrazelluläre APP-Expressionsniveau auf Proteinebene mittels Western Blot (Abbildung 5-1) und die Menge an sezerniertem sAPP α zusätzlich quantitativ mittels ELISA bestimmt. Die massive intrazelluläre APP-Expression der HEK-APP Zellen korreliert mit der Detektion von sAPP α im Überstand. Der im Western Blot verwendete Antikörper 6E10 ist in der Lage spezifische sAPP α im Überstand nachzuweisen und nicht sAPP β , dem keine protektiven Eigenschaften zugeschrieben werden (Furukawa et al., 1996b). Eine Quantifizierung durch einen ELISA ergab eine mittlere Menge an sAPP α von ca. 70 ng/ml (Abbildung 5-1.B). Währenddessen sezernierten untransfizierte HEK293 Zellen wesentlich geringere Mengen an sAPP α in den

Kulturüberstand, was auf die geringe endogene Expression von APP zurückzuführen ist. Parallel zur Analyse auf Proteinebene, konnte durch quantitative Echtzeit PCR eine um das 80fache gesteigerte APP-Expression auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (Abbildung 5-1.C) Für beide Analyseverfahren wurden Zellkulturen mit einer 80%igen Konfluenz ausgesät und für 24 h inkubiert. Für den ELISA wurde im Kulturmedium für diesen Zeitraum kein FCS verwendet. Für die folgenden Experimente sind die konditionierten Medien in einem Verhältnis von 1:1 mit frischem Vollmedium versetzt worden. Es ist also davon auszugehen, dass sAPP α in einer Endkonzentration von ca. 35 ng/ml für die Präinkubation eingesetzt wurde. In den folgenden Experimenten wurde konditioniertes Medium von untransfizierten HEK293 Zellen, welches für die Präinkubation verwendet wurde, als „Kon“ gekennzeichnet. Während sAPP α -haltiges konditioniertes Medium von HEK-APP Zellen mit der Bezeichnung „sAPP“ deklariert wurde.

5.1.2 KONDITIONIERTE ÜBERSTÄNDE VON HEK-APP ZELLEN SCHÜTZEN PC12 ZELLEN VOR DER DURCH PROTEASOMALEN STRESS INDUZIERTEN APOPTOSE

Da für sAPP α neuroprotektive Eigenschaften bekannt sind (Mattson et al., 1993a; Mattson et al., 1999), wurde zunächst überprüft, ob eine 24stündige Präinkubation mit konditioniertem Medium vor induziertem Stress schützen kann. Der hierfür verwendete Stress-Stimuli Epoxomicin (Abbildung 5-2) ist ein irreversibler Proteasom-Inhibitor, welcher die proteolytisch aktiven Zentren des 20S-Proteasoms hemmt (Meng et al., 1999).

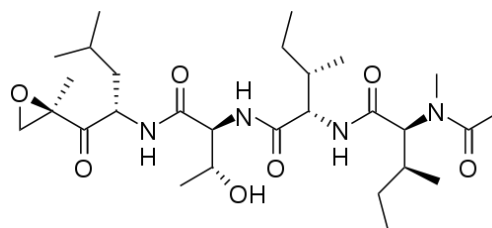


ABBILDUNG 5-2: Strukturformel des Proteasom-Inhibitor Epoxomicin.

Proteasomaler Stress steht in engem Zusammenhang mit der Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen, so auch der Alzheimer Krankheit. So liegen den Befunden von Ubiquitin-positiven Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten, einer Störung des Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) zu Grunde (Mori et al., 1987; Perry et al.,

1987; Song and Jung, 2004; van Leeuwen et al., 1998). In folgenden Experimenten wurde untersucht, ob sAPP α vor diesem, durch Epoxomicin-induzierten, proteasomalem Stress schützt.

PC12 Zellen wurden hierfür 24 h mit konditioniertem Medium präinkubiert. Daraufhin erfolgte eine Behandlung mit 50 nM Epoxomicin für entweder 24 h oder 36 h. Da Epoxomicin in DMSO gelöst wurde, wurden parallel Kontrollkulturen mitgeführt, die zu Epoxomicin volumenäquivalent behandelt wurden (Kon). Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden die Zellen mit Hoechst und Propidiumiodid (PI) gefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Da Propidiumiodid nur durch perforierte Zellmembranen gelangen kann, interkaliert es in DNA von spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen. Die Färbung mit Hoechst ermöglicht die Einordnung von morphologischen Veränderungen des Zellkerns wie Kernkondensierungen bzw. Kernfragmentierungen. Diese beiden Farbstoffe stellen eine Möglichkeit dar *in vitro* Zelltod zu quantifizieren und zwischen Apoptose und Nekrose zu differenzieren (Kögel et al., 2005).

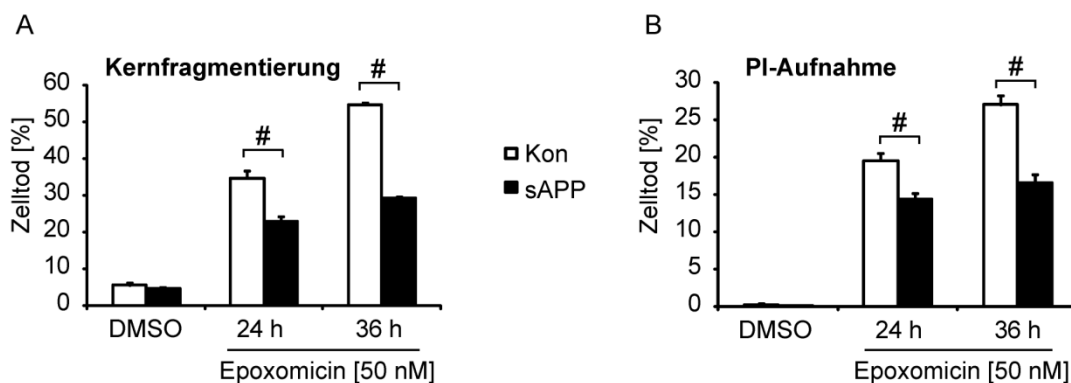


ABBILDUNG 5-3: sAPP schützt PC12 Zellen vor Zelltod induziert durch proteasomalen Stress. PC12 Zellen wurden für 24 h mit sAPP-haltigem konditioniertem Medium (sAPP) oder mit Kontrollmedium (Kon) vorbehandelt. Nach darauffolgender Inkubation mit Epoxomicin für 24 h bzw. 36 h erfolgte die Färbung mit Hoechst und PI. Als Kontrolle wurde eine volumenäquivalente Behandlung mit DMSO für 36 h mitgeführt. Anschließend wurden 2000-2500 Zellen aus n = 4 unabhängigen Kulturen pro Zeitpunkt und Behandlung ausgewertet. (A) Abgebildet ist der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen, die Kernfragmentierungen aufwiesen, gegenüber der Summe aller Hoechst-gefärbten Zellen. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil an PI-positiven Zellen gegenüber den Hoechst-gefärbten. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM der 4 unabhängigen Kulturen. (# p < 0,05 wurde als signifikant eingestuft)

Eine Behandlung der PC12 Zellen mit Epoxomicin über 24 h und 36 bewirkt einen Anstieg an apoptotischen und nekrotischen Zellen (Abbildung 5-1). Eine vorangegangene

Präinkubation mit sAPP zeigte im Vergleich zum Kontrollmedium ein signifikant verringertes Ausmaß an Zelltod in den Kulturen. Ein protektiver Effekt durch sAPP konnte somit für beide Behandlungszeiträume validiert werden.

Ein weiterer Beleg für die protektive Wirkung von sAPP unter proteasomalen Stressbedingungen ergaben Analysen der Aktivität von Effektor-Caspasen. Der Messung der Enzymaktivität ging ebenfalls eine 24stündige Präinkubation mit konditioniertem Medium und anschließender Epoxomicin-Behandlung voraus. Die beobachtete, signifikant verringerte Zelltodrate ließ sich mit der Aktivität der Effektor-Caspasen korrelieren. Hauptsächlich wird in dem Caspase-Assay die Aktivität von Caspase-3 ähnlichen Caspasen detektiert und als Funktion der DEVD-Spaltung gegen die Zeit dargestellt. Die mit DMSO als Lösungsmittel kontrollbehandelten Kulturen zeigten keine detektierbare Aktivierung von Caspasen. Eine Behandlung für 20 h mit 50 nM Epoxomicin zeigte eine Induktion der Enzymaktivität, die signifikant durch sAPP α -haltigen Überstand verringert war (Abbildung 5-4).

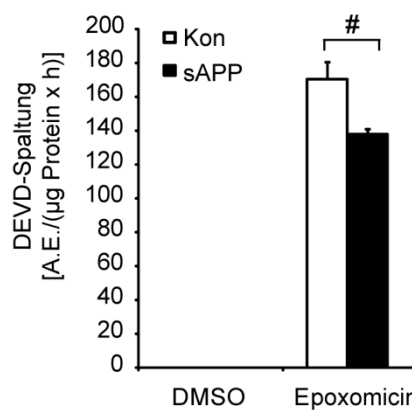


ABBILDUNG 5-4: sAPP schützt PC12 Zellen vor Caspase-abhängiger Apoptose induziert durch proteasomalen Stress. PC12 Zellen wurden mit Kontrollüberständen (Kon) oder sAPP α -haltigen Überständen (sAPP) für 24 h präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Epoxomicin (50 nM) oder volumenäquivalent DMSO für 20 h. Nach Ende der Behandlung erfolgten die Lyse der Zellen und die Messung der Caspase-Aktivität. Die Aktivität der Caspasen wurde photometrisch, indirekt über Zugabe des geeigneten fluorogenen Substrates AC-DEVD-AMC (10 μ M) zu den Proteinlysaten, gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Kulturen. (# $p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft; A.E. = arbiträre Einheiten)

5.1.3 sAPP α , NICHT JEDOCH sAPP β SCHÜTZT DOSISABHÄNGIG VOR PROTEASOMALEM STRESS

Um die vorangegangenen Befunde zu festigen und um klären zu können, dass ausschließlich sAPP α für die Protektion verantwortlich zu machen ist, wurde aufgereinigtes sAPP α und sAPP β aus Überständen von COS7-Zellen verwendet.

Hierfür wurden Dosis-Wirkungskurven für beide APP-Fragmente unter Stressbedingungen erstellt (Abbildung 5-5). Die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den Experimenten mit konditionierten Überständen (vgl. 5.1.2).

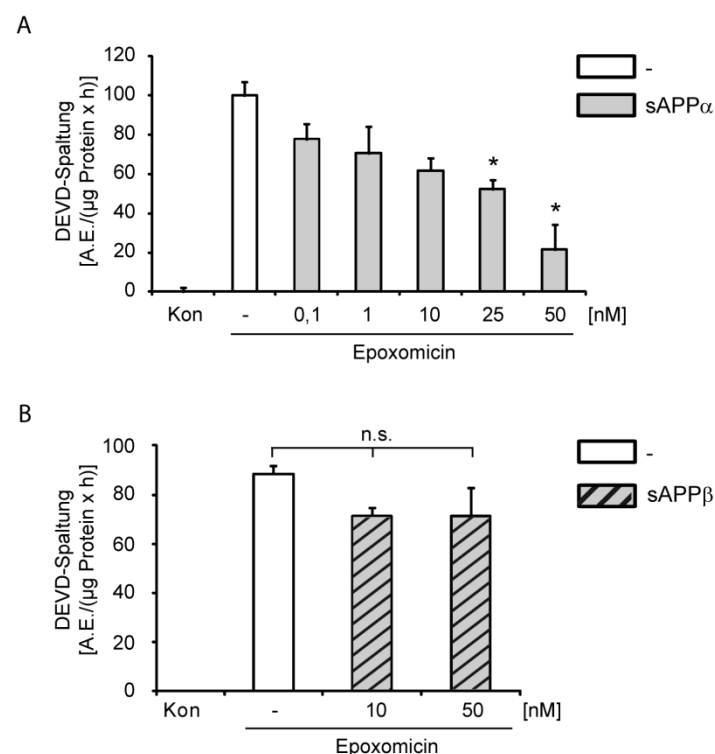


ABBILDUNG 5-5: sAPP α und nicht sAPP β schützt dosisabhängig vor proteasomalem Stress. PC12 Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Dosen an sAPP α bzw. sAPP β vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion von proteasomalem Stress durch Epoxomicin (20 h, 50 nM). Nach Ende der Behandlung wurden Gesamtzelllysate hergestellt und auf Caspase-Aktivität hin untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Kulturen. (* $p < 0,05$ wurde als signifikant gegenüber der Epoxomicin-Kontrolle (-) eingestuft; n.s. = nicht signifikant; A.E. = arbiträre Einheiten, mit (-) gekennzeichnete Kulturen sind nicht mit sAPP α präinkubiert aber mit Epoxomicin gestresst worden) Die APP-Fragmente wurden von Dr. Jakob Tschäpe und Prof. Dr. Ulrike Müller (Universität Heidelberg, Abteilung für Bioinformatik und Funktionelle Genomik) aufgereinigt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

PC12 Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen an sAPP α für 24 h präinkubiert und anschließend mit einer konstanten Dosis (50 nM) Epoxomicin für weitere 20 h gestresst. Schon ab einer minimalen sAPP α -Konzentration von 0,1 nM ist eine tendenzielle Protektion zu verzeichnen, die sich ab 25 nM als signifikant auszeichnet (Abbildung 5-5 A). Im Gegenzug zeigten sAPP β in den Konzentrationen 10 μ M und 50 μ M keine signifikanten Unterschiede zur Epoxomicin-behandelten Kontrolle (Abbildung 5-5 B). Zusammengenommen lässt sich feststellen, dass die beobachtete Protektion durch konditionierte Überstände aus HEK-APP Zellen mit der Protektion durch aufgereinigtes sAPP α korrelieren. Die Protektion lässt sich demnach auf den Bestandteil sAPP α im konditionierten Medium zurückführen.

5.1.4 SEKRETIERTES APP REDUZIERT DIE JNK-AKTIVIERUNG UNTER PROTEASOMALEM STRESS

Da bekannt ist, dass APP-Überexpression einen regulativen Effekt auf den pro-apoptotischen JNK-Signalweg hat (Kögel et al., 2005), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob proteasomale Stressbedingungen die Aktivierung dieses Signalweges beeinflusst. Dafür wurden PC12 Zellen mit konditionierten Medien präinkubiert und anschließend durch eine Epoxomicin-Behandlung Stress induziert. Eine UV-Bestrahlung, als genereller Aktivator des JNK-Signalweges, wurde hier als Positivkontrolle in die Untersuchungen implementiert.

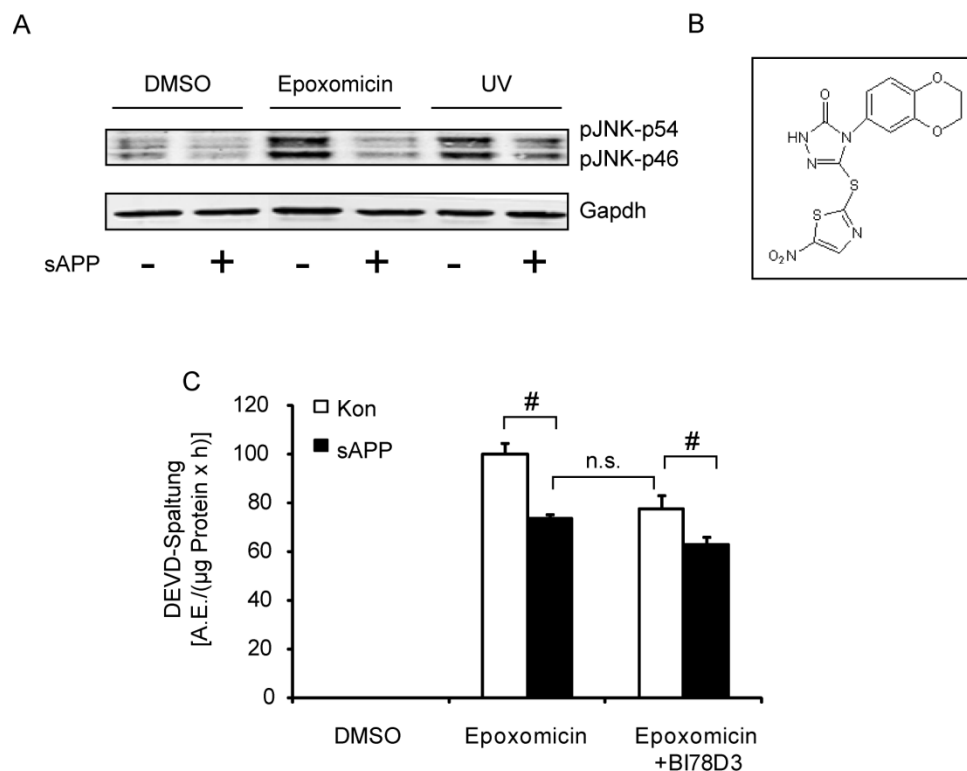


ABBILDUNG 5-6: sAPP inhibiert den JNK/c-Jun Signalweg. (A) PC12 Zellen wurden für 24 h mit konditioniertem Medium von HEK-APP Zellen (+) oder mit Kontrollmedium von untransfizierten HEK293 Zellen (-) präinkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion von proteasomalem Stress durch Epoxomicin (50 nM) bzw. genotoxischen Stress durch UV (100 J/m²). Nach Ende der 4stündigen Behandlung wurden Gesamtzelllysate hergestellt und auf Proteinebene auf die Phosphorylierung von JNK-p54 und JNK-p46 hin untersucht. Als Ladekontrolle im Western Blot diente Gapdh. (C) Die Caspase-Aktivität wurde nach 24stündiger Präinkubation mit konditioniertem Medium (Kon/sAPP) und anschließender Epoxomicin Behandlung (50 nm /20 h) ermittelt. Zur Epoxomicin-Behandlung wurden volumenäquivalente DMSO-Behandlungen mitgeführt. Darüberhinaus wurden einige Kulturen 1 h vor Gabe des Stress-Stimulus zusätzlich mit einem JNK-Inhibitor BI78D3 (400 nM) behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus n = 3 unabhängigen Experimenten (# p < 0,05 wurde als signifikant eingestuft; n.s. = nicht signifikant; A.E. = arbiträre Einheiten) (B) Strukturformel des JNK-Inhibitors BI78D3.

Die Induktion von proteasomalem Stress resultierte in einer Aktivierung von JNK, was sich im Phosphorylierungsgrad zeigt. Die Vorbehandlung mit sAPP weist bereits eine basale Reduktion der Phosphorylierung ohne zusätzliche Stressbehandlung (Abbildung 5-6 A). Proteasomaler Stress und genotoxischer Stress führten zu einer verstärkten Phosphorylierung von JNK, was einer erhöhten Aktivität entspricht. Diese konnte zum Teil durch sAPP verringert werden, was darauf hindeutet, dass sAPP in Lage ist den JNK-Signalweg partiell zu inhibieren. Um einen weiteren Nachweis zu erbringen, dass sAPP regulativ auf den pro-apoptotischen JNK-Signalweg einwirkt, wurde ein entsprechender Inhibitor für JNK verwendet. Dieser wurde 1 h vor dem proteasomalen Stress appliziert und blieb so insgesamt 21 h auf den Zellkulturen. Der benutzte kompetitive Inhibitor BI78D3 (Stebbins et al., 2008) bindet mit hoher Affinität an JIP1 (*JNK interacting protein 1*) und blockiert auf diese Weise den JNK-Signalweg.

Der JNK-Inhibitor bewirkte in Kulturen, die mit Kontrollüberständen und Epoxomicin behandelt waren, einen ähnlichen protektiven Effekt wie sAPP (Abbildung 5-6 C). Eine Präinkubation mit BI78D3 und sAPP führte im Vergleich zur Präinkubation ohne BI78D3 zu einer signifikant potenzierten Abnahme der Caspase-Aktivität. In den Lösungsmittel-behandelten Kontrollen konnte keinerlei Caspase-Aktivität detektiert werden. Gemeinsam mit der Analyse des Phosphorylierungsgrades von JNK im Western Blot bestätigt dies, dass sAPP α seine protektive Wirkung über eine partielle Inhibition des JNK-Signalweges entfaltet.

5.1.5 DIE PROTEKTION DURCH SAPP WIRD DURCH DIE AKTIVIERUNG DES PI3K/AKT SIGNALWEGES VERMITTELT

Auf Grund der Protektion durch die partielle Inhibierung des pro-apoptotischen JNK-Signalweges, stellte sich die Frage, ob die Aktivierung des anti-apoptotischen Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalweges zusätzlich zur Vermittlung der Protektion beitragen kann. Eine Interaktion der beiden Signalwege ist durch MLK3 (*mixed lineage kinase 3*) bekannt. MLK3 bezeichnet eine Kinase, die über die Aktivierung von JNK Zelltod induzieren kann. Akt wiederum kann den MLK3-vermittelten Zelltod durch Phosphorylierung von MLK3 an Serin 674, inhibieren (Barthwal et al., 2003). Zur Untersuchung der Beteiligung des PI3K/Akt Signalweges an der Vermittlung der Protektion wurde der spezifische, zellpermeable PI3K-Inhibitor LY294002 (Abbildung 5-7 B) verwendet. Dieser bindet reversibel an die ATP-Bindestelle der katalytischen Untereinheit und hemmt dadurch die Aktivität der Kinase (Vlahos et al., 1994).

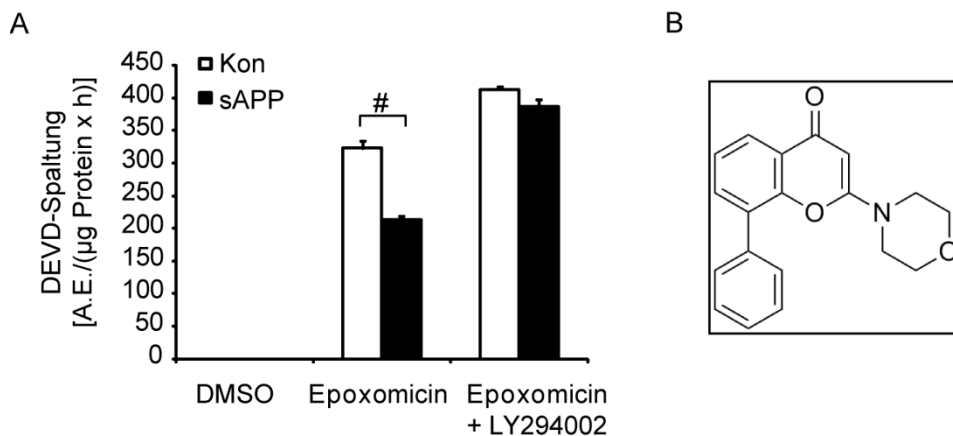


ABBILDUNG 5-7: sAPP aktiviert den anti-apoptotischen PI3K/Akt Signalweg. (A) PC12 Zellen wurden für 24 h mit konditionierten Überständen von HEK-APP Zellen (sAPP) bzw. mit Kontrollüberständen (Kon) vorbehandelt. 2 h vor Applikation des Proteasom-Inhibitors Epoxomicin (50 nM) für 20 h, erfolgte die Behandlung mit LY294002 (10 μM). Als Lösungsmittelkontrolle zur Epoxomicin-Behandlung wurden Kulturen volumenäquivalent mit DMSO behandelt. Nach Behandlungsende wurden die Zellen lysiert und auf Caspase-Aktivität hin analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Kulturen. ($\# p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft, A.E. = arbiträre Einheiten) (B) Strukturformel des PI3K-Inhibitors LY294002.

In den Zellkulturen, die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden, konnte keinerlei Aktivierung der Caspasen detektiert werden. Die Behandlung mit Epoxomicin resultierte in allen Gruppen in einer signifikant gesteigerten Caspase-Aktivität. Im Vergleich zur Präinkubation mit Kontrollüberständen verringerte die Präinkubation mit sAPP α -haltigem konditioniertem Medium signifikant den Caspase-abhängigen Zelltod unter proteasomalem Stress.

In Übereinstimmung mit der anti-apoptotischen Funktion des PI3K/Akt Signalweges, konnte durch die Inkubation mit den Kontrollüberständen in Anwesenheit des Inhibitors einen Anstieg in der Caspase-Aktivität in den PC12 Zellen nach proteasomalem Stress induziert werden. Interessanter Weise konnte die Protektion vor Apoptose durch sAPP in den Epoxomicin-behandelten Zellkulturen weitgehend durch die Gabe von LY294002 aufgehoben werden. Dies lässt auf eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges schließen, die PC12 Zellen vor durch proteasomalen Stress induzierten Zelltod schützt. sAPP α scheint darüber hinaus diesen Signalweg zu aktivieren und dadurch das Zell-Überleben unter Stress-Bedingungen zu begünstigen.

5.2 DER EINFLUSS VON DOCOSAHEXAENSÄURE AUF DEN METABOLISMUS UND DIE ZYTOPROTEKTIVE FUNKTION VON APP

In den bisher gezeigten Versuchen konnte die externe Gabe von sAPP α über konditionierte Überstände oder in aufgereinigter Form PC12 Zellen vor proteasomalem Stress schützen. Ferner soll jetzt überprüft werden, ob Docosahexaensäure (DHA) in der Lage ist auf den APP-Metabolismus einzuwirken und die Spaltung über α -Sekretasen günstig zu beeinflussen. Erwartet wird eine daraus resultierende Protektion vor zytotoxischem Stress. Dafür wurde die Fettsäure Docosahexaensäure (Abbildung 5-8 B) in kleine unilamellare Transfer-Liposomen verpackt, die eine bessere Aufnahme der Fettsäuren durch eine erhöhte Membranpermeabilität ermöglichen sollen (Hashimoto et al., 2006a). Die Liposomen wurden aus Lipoid[®]S100, einem Phosphatidylcholin aus fettfreiem Sojalecithin, hergestellt. Als Kontrolle für DHA wurde parallel die komplett gesättigte Form der DHA, die Docosansäure (DA), auch unter dem Trivialnamen Behensäure bekannt (Abbildung 5-8 A) in Liposomen verpackt. Um eventuelle Effekte durch Transferliposomen selbst auszuschließen, wurden diese ohne den Einbau von einer Fettsäure als weitere Kontrolle in den Versuchsaufbau eingebunden. DHA gehört zu den Omega-3 Fettsäuren und stellt eine essentielle, hochgradig ungesättigte Fettsäure (C22:6) dar. Es ist bekannt, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren essentiell für die Regulation der Fluidität von Membranen sind (Treen et al., 1992; Yang et al., 2010). Hierbei ist DHA eine der wichtigsten Fettsäuren und stellt einen integralen Bestandteil von Phospholipiden in den Membranen neuronaler Zellen im Gehirn (Yehuda et al., 1999) und speziell den Zellen der Netzhaut dar. Es ist ebenso bekannt, dass DHA in verschiedenen Prozessen wie Membran-Protein Interaktionen (Litman and Mitchell, 1996), Genexpression (Kitajka et al., 2002), Neurogenese (Beltz et al., 2007; Kawakita et al., 2006; Robson et al., 2010; Sakamoto et al., 2007; Wurtman et al., 2009) und Lernen (Fedorova et al., 2007; Hossain et al., 2009; Jiang et al., 2009) eine wichtige Rolle spielt.

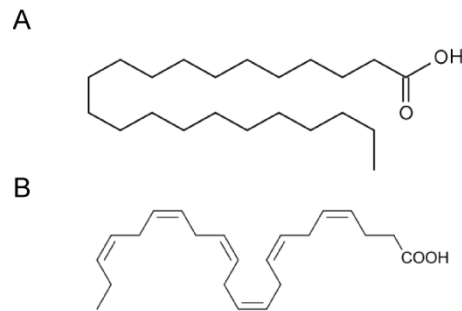


ABBILDUNG 5-8: Strukturformeln von (A) Docosansäure (DA) und (B) Docosahexaensäure (DHA).

In folgenden Experimenten wird untersucht, ob DHA und sein möglicher Einfluss auf die Metabolisierung von APP in zellulären Schädigungsmodellen eine protektive Funktion ausüben kann. Das hier implementierte Stress-Modell wird durch Behandlung mit einem Inhibitor der sarko- und endoplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen (SERCA), Thapsigargin, verwirklicht (Sagara and Inesi, 1991; Thastrup et al., 1989). Hierbei handelt es sich um ein Sesquiterpen-Lakton aus der Pflanze *Thapsia garganica*. Dieser Inhibitor induziert eine Freisetzung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Takemura et al., 1989) und in hohen Dosen auch einen Flux aus den Mitochondrien (Vercesi et al., 1993). Die Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) bewirkt eine Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen Chaperone im ER und führt dadurch zur Akkumulation falsch gefalteter Proteine. Dieser beschriebene Mechanismus wird allgemein unter ER-Stress zusammengefasst, welcher eine sogenannte *unfolded protein response* (UPR; zelluläre Antwort auf ungefaltete Proteine) nach sich zieht. Des Weiteren forciert die massive Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, unabhängig von ER-Stress, die Aktivierung anderer Signalwege, die zusätzlich apoptotische Mechanismen begünstigen.

5.2.1 ETABLIERUNG DER DOSIS-WIRKUNGSBEZIEHUNG DER THAPSIGARGIN- UND STAUROSPORIN-INDUZIERTEN APOPTOSE IN HEK-APP ZELLEN

Für die Etablierung des Thapsigargin-Schädigungsmodells wurden HEK-APP Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Thapsigargin behandelt. Dafür wurden zunächst Dosis-Wirkungskurven für die verwendeten Stimuli erstellt. Um die dosisabhängige Toxizität für Thapsigargin und Staurosporin im HEK-APP Zellmodell zu ermitteln, wurden zuerst Zellen mit unterschiedlichen Dosen an Thapsigargin behandelt, um anschließend eine Färbung mit Hoechst und Propidiumiodid (PI) anzufertigen. Diese Methode ermöglicht eine quantitative Aussage über apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltod (vgl. 5.1.2). Des Weiteren wurden im Caspase-Assay verschiedene Behandlungsintervalle untersucht, um den linearen Bereich bezüglich der Caspase-Aktivierung im Verlauf der Apoptose zu ermitteln. Hierfür wurde Staurosporin als Positivkontrolle implementiert. Staurosporin findet hier Anwendung, da es ein potenter Kinaseinhibitor darstellt, der als klassischer Apoptose-Stimulus wirkt.

Die Quantifizierung der PI-Aufnahme stellt ein Korrelat zu nekrotischem Zelltod dar und zeigt innerhalb eines konstanten Behandlungszeitraumes von 16 h ab einer Konzentration von 3 μM Thapsigargin einen signifikanten Anstieg gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abbildung 5-9 A). Variiert man die Behandlungszeiträume bei konstanter Konzentration an Thapsigargin (1 μM) erhält man nach 24 h einen signifikanten Anstieg der Caspase-Aktivität (Abbildung 5-9 B). Zusammengenommen erzielt man einen optimalen Behandlungseffekt nach 24 h mit einer Konzentration von 1 μM für Thapsigargin im HEK-APP Zellmodell. Diese optimale Behandlungsdauer und Dosis wurde für die folgenden Experimente mit HEK-APP Zellen verwendet. Die Dosis-Wirkungskurve für Staurosporin zeigte bereits nach 8 h mit einer Konzentration von 1 μM einen signifikanten Anstieg der Caspase-Aktivierung (Abbildung 5-9 D). Da Staurosporin ebenfalls in DMSO gelöst ist, wurde auch hier eine volumenäquivalente Dosis an DMSO als Kontrollbehandlung mitgeführt. Die Verwendung von Staurosporin war für jedes Experiment, in dem Caspase-Aktivierung quantifiziert werden sollte, obligat und wurde mit der hier ermittelten Konzentration und Behandlungsdauer für HEK-APP Zellen eingesetzt.

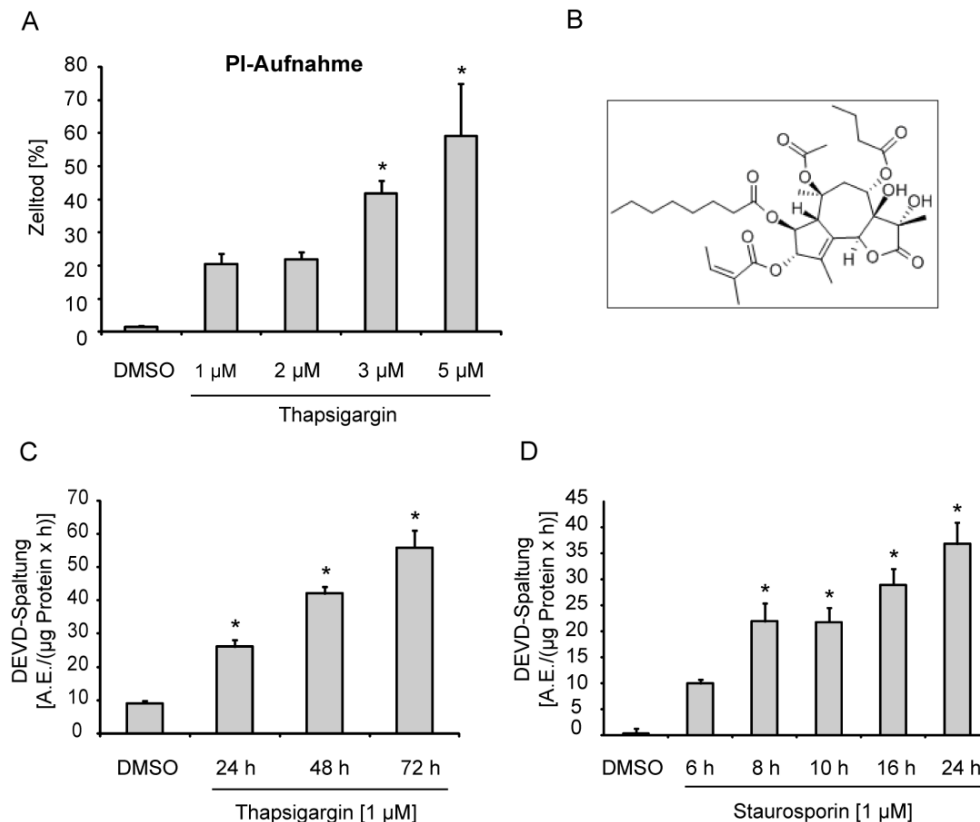


ABBILDUNG 5-9: Etablierung der Dosis und der Behandlungsdauer für Thapsigargin und Staurosporin.

(A) HEK-APP Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Thapsigargin behandelt. Da Thapsigargin in DMSO gelöst ist, wurde eine der höchsten Konzentration an Thapsigargin (5 µM) volumenäquivalente DMSO Kontrollbehandlung mitgeführt (DMSO). Nach Ende der 16 h-Behandlung wurden die Zellen mit PI und Hoechst gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an PI-positiven Zellen gegenüber den Hoechst-positiven Zellen, um Zelltod zu quantifizieren. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte \pm SEM aus je 100 Zellen von 4 unterschiedlichen Kulturen dar. (B) Strukturformel von Thapsigargin. (C + D) Zur Analyse der Caspase-abhängigen Apoptose wurden HEK-APP Zellen über unterschiedliche Zeiträume mit einer konstanten Konzentration an Thapsigargin bzw. Staurosporin behandelt. Nach Ablauf der Behandlung wurden Zelllysate hergestellt, um die DEVD-Spaltung, welche ein Korrelat der Caspase-Aktivierung darstellt, zu vermessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n = 4 unabhängigen Kulturen (p * < 0,05 wurde als signifikant eingestuft; A.E. = arbiträre Einheiten).

5.2.2 DIE LANGZEITBEHANDLUNG VON HEK-APP ZELLEN MIT DHA ERHÖHT DIE MEMBRANFLUIDITÄT UND DIE SEKRETION VON SAPP α

Vor der Implementierung des Schädigungsmodells wurde in einem experimentellen Ansatz überprüft, ob die Verpackung von Fettsäuren in Transferliposomen eine effektive Möglichkeit darstellt, um die Aufnahme der Fettsäuren und deren Inkorporation in Zellmembranen zu begünstigen. Des Weiteren sollte eine Analyse der Überstände von APP-überexprimierenden HEK Zellen Aufschluss darüber geben, ob eine Modulierbarkeit des

APP-Metabolismus in Abhängigkeit von DHA gegeben ist. Zur Überprüfung der Aufnahme von DHA wurde der anteilige DHA-Gehalt an der Lipid-Gesamtmasse bestimmt. Für diesen Zweck wurden HEK-APP Zellen für 5 Tage mit 20 μ M an DHA, DA oder leeren Liposomen behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse des DHA-Gehaltes mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor. Für diese Analyse wurden zuerst die Lipide aus den Gesamtzelllysaten mit einer Methanol/Chloroform Fällung extrahiert. Anschließend wurden die Lipide verestert, um sie für die Gaschromatographie zugänglich zu machen. Der daran gekoppelte Flammenionisationsdetektor ermöglicht die quantitative Detektion von DHA. Den Einfluss der Inkorporation von DHA in die Zellmembranen auf die Membranfluidität wurde indirekt über die Bestimmung der Anisotropie ermittelt. Hierbei macht man sich die Eigenschaft von Membranen zu Nütze, dass alle intramembranösen Bestandteile eine relativ freie Beweglichkeit besitzen. Bei der sogenannten Fluoreszenz Polarisationspektroskopie werden membrangebundene Fluoreszenzsonden (TMA-DPH) verwendet. Ist die Sonde in einer starren Umgebung eingebettet, so wird die Emissionsstrahlung in der gleichen Richtung polarisiert. Erlaubt das Umfeld gewisse Bewegungs-Freiheitsgrade, so wird die Emissionsstrahlung depolarisiert. Die Polarisation, die gleichgesetzt mit der Anisotropie ist, stellt also eine Möglichkeit dar, Membranfluidität messbar zu machen. Das bedeutet für eine Zellmembran, dass der Anstieg der Messgröße Anisotropie eine verringerte Membranfluidität kennzeichnet.

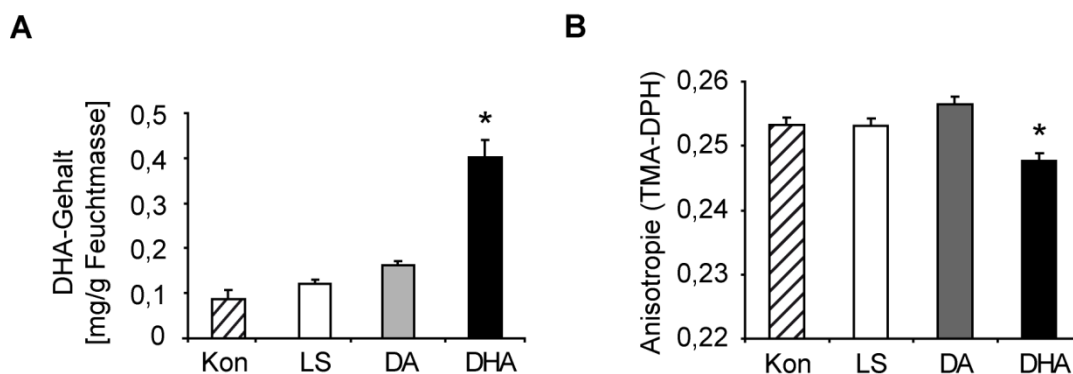


ABBILDUNG 5-10: Aufnahme von DHA und deren Einfluss auf die Membranfluidität. HEK-APP Zellen sind für 5 Tage mit 20 μ M DHA, DA oder leeren Liposomen (LS) behandelt worden. Als Kontrolle (Kon) wurden unbehandelte Kulturen mitgeführt. (A) Der DHA-Gehalt wurde mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem Flammenionisationsdetektor ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten (* $p < 0,001$ wurde als signifikant eingestuft). (B) Veränderungen der Membranfluidität, die invers mit der Anisotropie korreliert, wurden mittels Fluoreszenzpolarisation ermittelt. Dabei wurde der Farbstoff TMA-DPH verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ unabhängigen Experimenten (* $p < 0,001$ wurde als signifikant eingestuft). (angefertigt in der Arbeitsgruppe von Dr. Gunter Eckert, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe-Universität Frankfurt)

Die Behandlung der HEK-APP Zellen mit leeren Liposomen bzw. mit Liposomen, die Docosansäure beinhalten, zeigten bei der Ermittlung des zellulären DHA-Gehaltes keinerlei Unterschied zu den Kulturen, die unbehandelt blieben (Abbildung 5-10 A). Dagegen zeigten HEK-APP Zellen, die mit DHA-Liposomen behandelt wurden, einen signifikant erhöhten Gehalt an DHA (+420%) als die unbehandelte Kontrolle. Die Messung der Anisotropie zeigt einzig in mit DHA-Liposomen behandelten Zellkulturen eine signifikante Verringerung. Die Behandlung mit den Kontroll-Liposomen zeigte keinen Einfluss auf den beobachteten Parameter. Da sich die Membranfluidität reziprok zur Anisotropie der Membran verhält, kann eine erhöhte Fluidität in Abhängigkeit von DHA festgestellt werden (Abbildung 5-10 B). Im nächsten experimentellen Ansatz soll überprüft werden, ob eine Langzeitbehandlung mit DHA regulativ auf die Prozessierung von APP einwirken kann. Hierfür wurden HEK-APP Zellen für 9 Tage mit DHA inkubiert, wobei an jedem zweiten Behandlungstag ein Mediumwechsel erfolgte. Das frische Medium wurde mit 20 μ M DHA supplementiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Kulturen mitgeführt. Um den Metabolismus von APP zu analysieren, wurden zwei verschiedene Parameter betrachtet. Für den anti-amyloidogenen Prozessierungsweg wurde sAPP α in den Überständen der Zellkulturen und für den amyloidogenen Prozessierungsweg das C-terminale Fragment C99 in den Gesamtzelllysaten nachgewiesen.

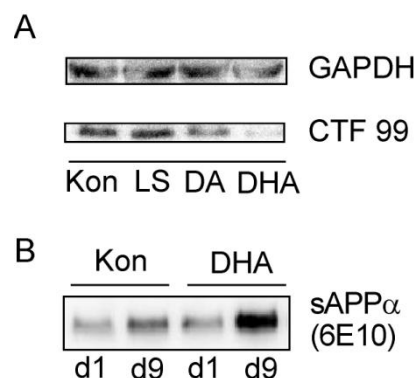


ABBILDUNG 5-11: Nachweis von sAPP α und CTF99 nach Langzeitinkubation mit Liposomen. HEK-APP Zellen wurden für 9 Tage mit Liposomen behandelt. (A) Nach Ende der Behandlung wurden Gesamtzelllysate auf die Expression von CTF99 im Western Blot hin untersucht. Als Kontrollen wurden unbehandelte Kulturen (Kon), mit leeren Liposomen behandelte Zellen (LS) und mit DA-Liposomen behandelte Zellen (DA) mitgeführt. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B) Am 1. Tag der Behandlung (d1) und am 9. Tag der Behandlung (d9) wurden Überstände der behandelten Zellen gesammelt und anschließend für einen Western Blot vorbereitet. Aufgetragen wurden Überstände von Kontrollbehandlung und DHA-Behandlung für beide Zeitpunkte und auf ihre Menge an sAPP α untersucht. Benutzt wurde ein 6E10 Antikörper, der einen spezifischen Nachweis für sAPP α erbringt. (d = Behandlungstag) (angefertigt in der Arbeitsgruppe von Dr. Gunter Eckert, Pharmakologisches Institut für Naturwissenschaftler, Goethe-Universität Frankfurt)

Die Analyse des C-terminalen Fragmentes C99, welches aus Spaltung von APP durch β -Sekretase entsteht, ergab einen einheitlichen Expressionslevel im Western Blot für alle Kontrollbehandlungen. Dagegen resultierte die Behandlung mit DHA in einem deutlich niedrigeren C99-Gehalt in den Gesamtzelllysaten. Dies korreliert mit einer verringerten Aktivierung des amyloidogenen Prozessierungsweges von APP in Anwesenheit von DHA. Die Analyse der Überstände zeigte in der Kontrollbehandlung einen leicht höheren Gehalt an sAPP α nach der 9tägigen Behandlung. Die DHA-Behandlung dagegen induzierte eine deutlich höhere sAPP α -Sekretion in den Überstand, was mit einer erhöhten α -Sekretase Spaltung von APP in Zusammenhang gebracht werden kann.

5.2.3 DIE LANGZEITBEHANDLUNG VON HEK-APP ZELLEN MIT DHA SCHÜTZT VOR DEM DURCH THAPSIGARGIN INDUZIERTEN ZELLTOD

Da die Störung der Ca^{2+} -Homöostase eine entscheidende Rolle in der Alzheimer Demenz spielt, stellte sich die Frage, ob eine Behandlung mit DHA vor einem toxischem Ca^{2+} -Einstrom schützen kann. Dafür wurden HEK-APP Zellen einer Langzeitbehandlung mit Liposomen unterzogen. Die Applikation der in Liposomen verpackten Fettsäuren erfolgte in einer Konzentration von 20 μM . Nach 5 bzw. 9 Tagen der Behandlung erfolgte die Induktion der Ca^{2+} -Freisetzung durch Thapsigargin-Behandlung. Eine Bewertung der Protektion wird durch die Ermittlung der Caspase-Aktivität ermöglicht.

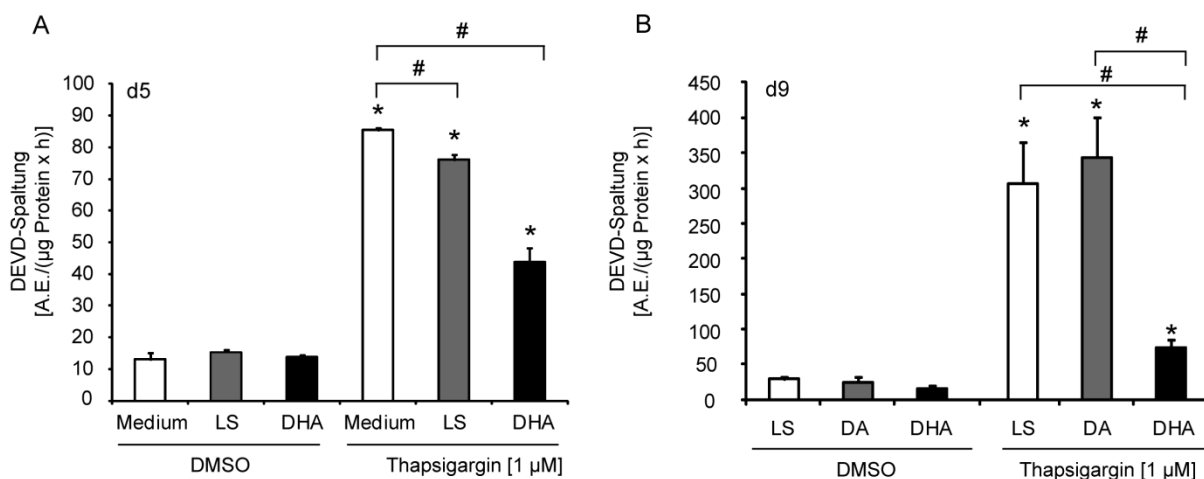


ABBILDUNG 5-12: DHA vermittelte Protektion vor Thapsigargin-induzierter Apoptose.(A) HEK-APP Zellen wurden für 5 Tage (d5) mit leeren Liposomen (LS) bzw. DHA-Liposomen behandelt. Unbehandelte Kulturen (Medium) wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend erfolgte die Behandlung für 24 h mit Thapsigargin oder der Lösungsmittelkontrolle DMSO. Nach Ende der Behandlung erfolgte die Lysierung der Zellen und die quantitative Analyse der Caspase-Aktivität. (B) HEK-APP Zellen wurden für 9 Tage (d9) mit leeren Liposomen (LS), DA-Liposomen (DA) bzw. DHA-Liposomen (DHA) behandelt. Nach Abschluss der Vorbehandlung folgte die Behandlung mit Thapsigargin oder volumenäquivalent dazu mit DMSO. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$ wurde als signifikant zur jeweiligen DMSO-Kontrolle eingestuft, # $p < 0,05$ wurde als signifikant innerhalb der Thapsigargin-behandelten Gruppen eingestuft; A.E. = arbiträre Einheiten)

In beiden beobachteten Zeitpunkten resultierte die Kontrollbehandlung mit DMSO in einer geringen basalen Caspase-Aktivität. Es konnten nur marginale Unterschiede zwischen den einzelnen Vorbehandlung festgestellt werden. Die Thapsigargin-Behandlung induzierte an Tag 5 und an Tag 9 einen signifikanten Anstieg der Caspase-Aktivität, was als Korrelat einer erhöhten Apoptose-Rate dient. Diese kann in Anwesenheit von DHA minimiert werden. An Tag 5 der Behandlung stellt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der DHA-

Behandlung und der Kontrollbehandlung ein (Abbildung 5-12 A). Dieser protektive Effekt tritt nach 9 Tagen Behandlungszeit verstärkt hervor und ist zwischen beiden Kontrollbehandlungen und der DHA-Behandlung unter Thapsigargin-Stress klar erkennbar (Abbildung 5-12 B). Ein signifikanter Unterschied zur jeweiligen DMSO-Kontrolle bleibt allerdings bestehen.

5.2.4 sAPP α IST ESSENTIELL FÜR DEN ZYTOPROTEKTIVEN EFFEKT VON DHA

Auf der Beobachtung basierend, dass eine erhöhte Sekretion von sAPP α und eine erhöhte Protektion mit der DHA-Behandlung assoziiert sind, stellte sich die Frage, ob diese protektiven Effekte auf sAPP α zurückzuführen sind. Dafür wurden untransfizierte HEK293 Zellen und APP-überexprimierende HEK-APP Zellen für 5 Tage mit leeren Liposomen (LS) oder mit DHA-Liposomen (DHA) zur Herstellung von konditioniertem Medium behandelt. HEK293 Zellen wurden mit diesen konditionierten Medien für 24 h vorbehandelt, um anschließend mit Thapsigargin gestresst zu werden.

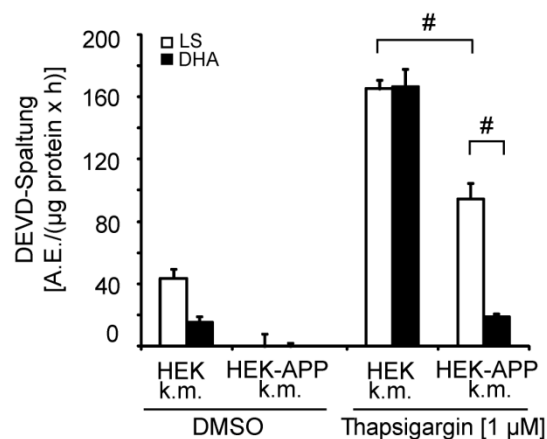


ABBILDUNG 5-13: Die Protektion von DHA wird durch sAPP α vermittelt. HEK-APP und HEK293 Zellen wurden für 5 Tage mit leeren Kontroll-Liposomen (LS) bzw. DHA-Liposomen (DHA) zur Herstellung von konditionierten Medien behandelt. Diese Überstände sind für eine 24stündige Präinkubation von untransfizierten HEK293 Zellen verwendet worden, die anschließend für 48 h mit Thapsigargin bzw. DMSO inkubiert wurden. HEK k.m. bezeichnet die Inkubation mit konditioniertem Medium von HEK293 Zellen die entweder mit LS oder DHA vorbehandelt wurden. HEK-APP k.m. bezeichnet die Inkubation mit konditioniertem Medium von HEK-APP Zellen, die entweder mit LS oder DHA vorbehandelt wurden. Die Caspase-Aktivität wurde durch DEVD-Spaltung ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus n = 4 unterschiedlichen Kulturen. (# p < 0,05 wurde als signifikant unterschiedlich eingestuft, A.E. = arbiträre Einheiten).

Die Behandlung der HEK293 Zellen mit konditionierten Überständen von HEK-APP Zellen minimierte tendenziell die basale Caspase-Aktivität unter Kontrollbedingungen (DMSO-Kontrolle). Unter Stressbedingungen schützt die Vorbehandlung mit konditioniertem Medium von HEK-APP Zellen, die mit leeren Liposomen präinkubiert wurden, HEK293 Zellen signifikant vor Apoptose. Eine Präinkubation mit DHA-vorbehandelten HEK-APP Überständen potenziert diesen protektiven Effekt. Der Wirkungsgrad ist vergleichbar mit dem nach einer Langzeitbehandlung über 9 Tage mit 20 μ M DHA (Abbildung 5-12 B). Überstände aus untransfizierten HEK293 Zellen zeigten unabhängig von der DHA-Behandlung keine schützende Wirkung. Die Ergebnisse legen nahe, dass sAPP α aus den Überständen der APP-überexprimierenden HEK-APP Zellen für die Vermittlung des Schutzes vor dem Zelltod essentiell ist.

5.2.5 ETABLIERUNG DES THAPSIGARGIN-INDUZIERTEN SCHÄDIGUNGSMODELLS IN NEURONALEN PC12 ZELLEN

Zur Untersuchung möglicher Signalwege durch die die Protektion via sAPP α im Thapsigargin-Schädigungsmodell vermittelt werden könnte, wurden PC12 Zellen als Modell gewählt. Es handelt sich hierbei um Phaeochromozytomzellen der Ratte (Greene and Tischler, 1976), die für die Untersuchung der Signalwege unter proteasomalem Stress verwendet wurden (vgl. 5.1.4 und 5.1.5). Hierfür wurde zuerst eine Kinetik für die Behandlung mit Thapsigargin erstellt.

Die Behandlung der PC12 Zellen mit Thapsigargin resultiert in einem Anstieg der Caspase-Aktivität ab einer Behandlungsdauer von 12 h. Die erstellte Kinetik zeigt einen Anstieg bis zum Zeitwert von 16 h (Abbildung 5-14). Dieser wurde für die folgenden Experimente als optimaler Zeitpunkt mit der höchsten Apoptose-Rate gewählt. Eine zusätzliche optische Kontrolle zeigte typische morphologische Merkmale der Apoptose. Der Abfall der Caspase-Aktivität in der Kinetik deutet darauf hin, dass ein gewisser Teil der Zellpopulation den apoptotischen Zelltod nach 20stündiger Behandlung bereits durchlaufen hat und die Aktivität der Effektorcaspasen dadurch für die gesamte Population verringert erscheint.

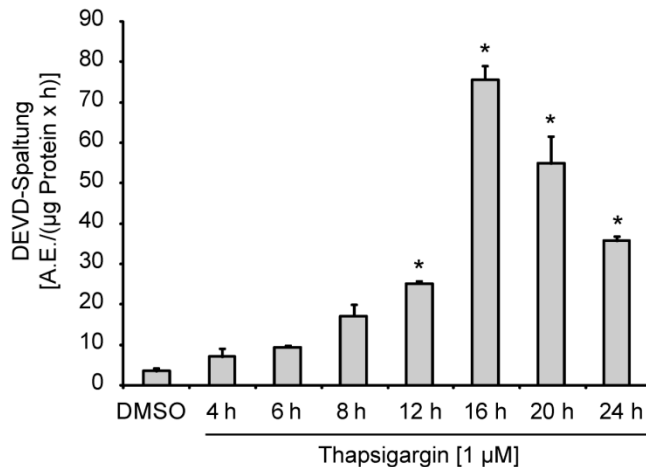


ABBILDUNG 5-14: Kinetik der Thapsigargin-induzierten Caspase-abhängigen Apoptose in PC12 Zellen. PC12 Zellen wurden mit konstanter Dosis Thapsigargin über verschieden lange Zeiträume behandelt. DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Die Analyse der Caspase-Aktivität erfolgte durch die Zugabe des fluorigenen DEVD-AMC-Substrates (10 μM). Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Kulturen. (* $p < 0,05$ wurde als signifikant zur DMSO-Kontrolle eingestuft; A.E. = arbiträre Einheiten)

5.2.6 SEKRETIERTES APP SCHÜTZT PC12 ZELLEN VOR DER THAPSIGARGIN-INDUZIERTEN APOPTOSE

Für das vorangegangene Modell des proteasomalen Stresses im ersten Teil der Arbeit konnte bereits ein protektiver Effekt durch die Applikation von konditionierten Medien gezeigt werden (vgl. 5.1.2). Für die Störung der Kalziumhomöostase durch Behandlung mit Thapsigargin wurde ein analoger Ansatz in PC12 Zellen überprüft.

Hierfür wurden PC12 Zellen mit konditioniertem Medium von HEK293 bzw. von HEK-APP Zellen für 24 h vorbehandelt. Mit Ende dieser Behandlung wurde Thapsigargin appliziert und für die vorher bestimmte optimale Dauer auf den Kulturen belassen. Eine anschließende Analyse der Aktivierung der Effektorcaspasen wurde mittels DEVD-Spaltung durchgeführt.

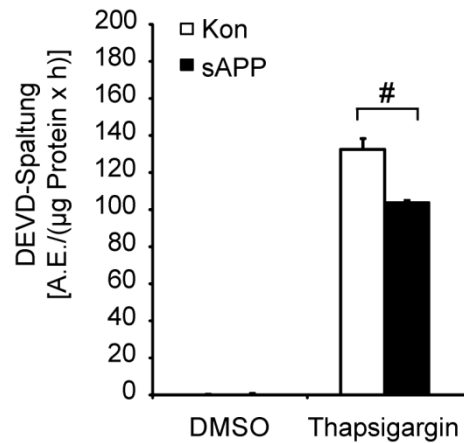


ABBILDUNG 5-15: sAPP schützt PC12 Zellen vor Apoptose induziert durch Ca^{2+} -Freisetzung. PC12 Zellen sind für 24 h mit konditioniertem Medium aus HEK293 Zellen (Kon) oder HEK-APP Zellen (sAPP) präinkubiert worden. Anschließend erfolgte Applikation von Thapsigargin (1 μM) für 16 h. Als Lösungsmittelkontrolle wurden DMSO-behandelte Kulturen mitgeführt. Die Analyse der Caspase-Aktivität erfolgte durch die Zugabe des fluorigenen DEVD-AMC-Substrates (10 μM). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. (# $p < 0,05$ wurde als signifikant unterschiedlich eingestuft; A.E. = arbiträre Einheiten)

Der Nachweis der Caspase-Aktivität mittels DEVD-Spaltung ergab für die Thapsigargin-Behandlung, der mit Kontrollüberständen vorbehandelten Kulturen, einen signifikanten Anstieg. In Abhängigkeit der Vorbehandlung mit sAPP α -haltigen Überständen konnte die Schädigung signifikant verringert werden. Die protektiven Effekte des konditionierten Mediums aus HEK-APP Zellen konnten somit für dieses Schädigungsmodell analog zum Modell des proteasomalen Stresses in PC12 Zellen evaluiert werden.

5.2.7 DIE PROTEKTION VOR DER THAPSIGARGIN-INDUZIERTEN APOPTOSE WIRD DURCH DIE MODULATION DES PI3K/AKT-SIGNALWEGES UND DES JNK-SIGNALWEGES VERMITTELT

Die bisher durchgeführten Experimente zeigten, dass sAPP α in der Lage ist den antiapoptotischen PI3K/Akt Signalweg zu aktivieren und dadurch eine Protektion vor proteasomalem Stress zu vermitteln. Analog soll untersucht werden, ob auch einer sAPP α -vermittelten Protektion vor der durch Ca^{2+} -Freisetzung-induzierten Apoptose, die Modulation des PI3K/Akt Signalweges zu Grunde liegt.

Hierfür wurden PC12 Zellen mit konditionierten Überständen von HEK293 oder HEK-APP Zellen für 24 h vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Thapsigargin (1 μM) für 16 h. Einige Kulturen wurden 2 h vor Applikation des Stress-Stimulus zusätzlich mit dem

zellpermeablen PI3K/Akt Inhibitor LY294002 behandelt. Nach Ende der Behandlung wurden zytosolische Proteinextrakte hergestellt und auf ihre Caspase-Aktivität hin untersucht.

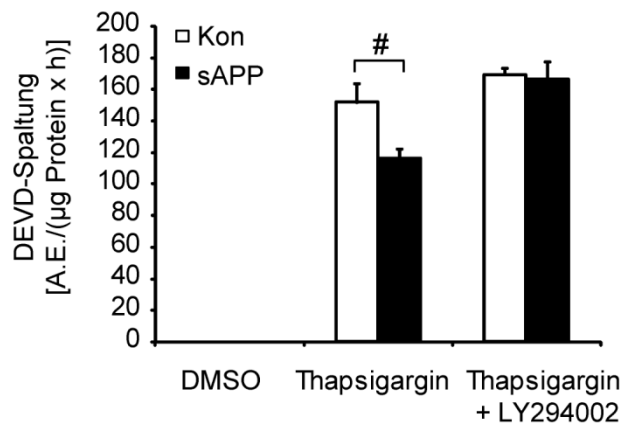


ABBILDUNG 5-16: Einfluss des PI3K/Akt Inhibitors LY294002 auf die sAPP α -vermittelte Protektion nach Ca²⁺-Freisetzung durch Thapsigargin. PC12 Zellen wurden für 24 h mit Überständen von HEK293 Zellen (Kon) bzw. von HEK-APP Zellen (sAPP) vorbehandelt. 2 h vor Applikation des Stress-Stimulus Thapsigargin (1 μ M) für 16 h erfolgte die Behandlung mit LY294002 (10 μ M). Als Lösungsmittelkontrolle zur Thapsigargin-Behandlung wurden Kulturen volumenäquivalent mit DMSO behandelt. Nach Behandlungsende wurden die Zellen lysiert und auf Caspase-Aktivität hin analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus n = 4 unabhängigen Kulturen. (# p < 0,05 wurde als signifikant eingestuft, A.E. = arbiträre Einheiten)

In den Zellkulturen, die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurden, konnte keinerlei Aktivierung der Caspasen detektiert werden. Die Behandlung mit Thapsigargin resultierte in allen Gruppen in einer signifikant gesteigerten Caspase-Aktivität. Eine signifikante Reduktion der Caspase-Aktivität konnte in Abhängigkeit von sAPP α in Abwesenheit des Inhibitors wiederholt nachgewiesen werden. Die Inhibition des anti-apoptotischen PI3K/Akt Signalweges in Kombination mit einer Thapsigargin-Behandlung resultierte in einer marginal erhöhten Apoptose-Rate im Vergleich zu den Kulturen, die nur mit Thapsigargin behandelt wurden. Die Protektion durch die Präinkubation mit sAPP α -haltigen Überständen konnte in Anwesenheit von LY294002 größten Teils aufgehoben werden (Abbildung 5-16). Daraus lässt sich schließen, dass die Protektion durch sAPP α vor Thapsigargin-induziertem Stress über die Modulation des anti-apoptotischen PI3K/Akt Signalweges partiell vermittelt wird.

Eine Beteiligung des pro-apoptotischen JNK Signalweges in der Vermittlung der Protektion durch sAPP α soll durch Analysen des Phosphorylierungsgrades von JNK untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Zellkulturen mit konditionierten Medien präinkubiert und anschließend für 4 h mit Thapsigargin behandelt.

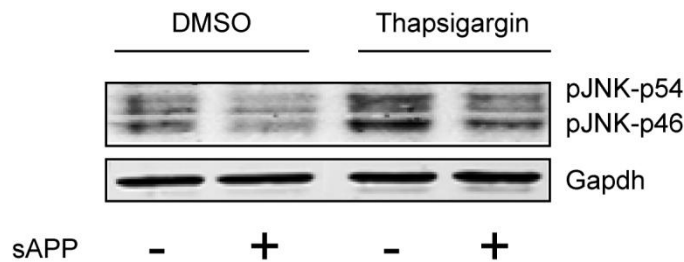


ABBILDUNG 5-17: Überstände von HEK-APP Zellen reduzieren die JNK-Aktivierung nach Ca^{2+} -Freisetzung induziert durch Thapsigargin. PC12 Zellen wurden für 24 h mit konditionierten Überständen von HEK293 (- sAPP) bzw. von HEK-APP Zellen (+ sAPP) präinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 1 μM Thapsigargin für 4 h. Als Lösungsmittelkontrolle wurden Kulturen volumenäquivalent mit DMSO behandelt. Nach Abschluss der Behandlung wurden Gesamtzelllysate hergestellt und auf Proteinebene auf die Phosphorylierung von JNK untersucht. Der verwendete Antikörper detektierte p54 und p46, wenn an den Positionen Thr183 und Tyr185 eine Phosphorylierung vorliegt. Gapdh diene als Ladekontrolle.

Die Analyse des Phosphorylierungsgrades und somit der Aktivierung von JNK ergab eine deutliche Induktion nach der Behandlung mit Thapsigargin. Doch schon der basale Phosphorylierungsgrad der Stress-Kinase zeigte einen klaren Unterschied zwischen den Vorbehandlungen mit konditionierten Überständen. In Abhängigkeit von sAPP α ist eine Repression der Aktivierung zu verzeichnen. Unter Stressbedingungen, ausgelöst durch Ca^{2+} -Freisetzung via Thapsigargin zeigt sich dieser protektive Effekt potenziert (Abbildung 5-17). Zusammengenommen offenbart sich die Modulation beider betrachteter Signalwege als Parameter in der sAPP α vermittelten Protektion. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen, die unter proteasomalem Stress erhoben wurden (vgl. 5.1.4 und 5.1.5).

5.2.8 NEUROPROTEKTION DURCH REKOMBINANTES, AUFGEREINIGTES SAPP α

Die bisher gezeigten Ergebnisse weisen sAPP α als protektives Spaltprodukt, das aus der Prozessierung von APP hervorgeht, aus. Es konnte gezeigt werden, dass ein durch sAPP α -vermittelter Schutz vor proteasomalem Stress und vor toxischer Ca^{2+} -Freisetzung vorlag. In den nachfolgenden Experimenten soll überprüft werden, ob die durch konditionierte Überstände vermittelte Protektion mit rekombinanten, aufgereinigtem sAPP α aus verschiedenen Expressionssystemen zu reproduzieren ist. Zum einen wurden COS7 Zellen, welche stabil mit der extrazellulären Domäne von APP695 transfiziert waren, und zum anderen 6xHis-sAPP α , welches aus *Pichia pastoris* GS115 aufgereinigt wurde, benutzt. Eine

Aufreinigung aus den COS7 Zellen ermöglichte die Fusion des Proteinkonstrukts an das Fc-Fragment eines humanen Immunglobulin G. Das in den Überstand sezernierte Fc-sAPP konnte so mittels Protein-A-Sepharose gebunden und extrahiert werden.

Das so extrahierte Fc-sAPP konnte in PBS aufgenommen für Studien zur Caspase-Aktivierung unter Ca^{2+} -Freisetzung bedingt durch Thapsigargin-Behandlung benutzt werden. Eine Behandlung mit Staurosporin als klassischer Apoptosestimulus wurde als weiterer Stimulus implementiert.

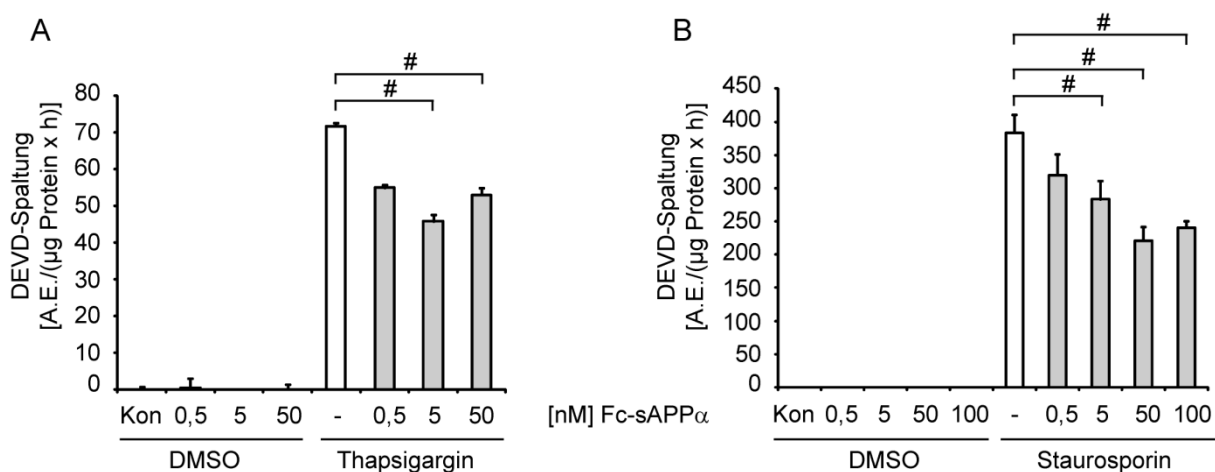


ABBILDUNG 5-18: Fc-sAPP schützt dosisabhängig vor Ca^{2+} -Freisetzung ausgelöst durch Thapsigargin und vor Staurosporin-induzierter Apoptose. PC12 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an Fc-sAPP für 24 h präinkubiert und anschließend mit (A) Thapsigargin (1 µM) für 16 h oder mit (B) Staurosporin (1 µM) für 6 h behandelt. Analog wurden präinkubierte Kontrollkulturen mit DMSO behandelt. Die Analyse der Caspase-Aktivität erfolgte durch die Zugabe des fluorigenen DEVD-AMC-Substrates (10 µM). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. (# $p < 0,05$ wurde als signifikant unterschiedlich eingestuft; A.E. = arbiträre Einheiten) Das aufgereinigte Fc-sAPP wurde freundlicherweise von Frederik Baumkötter und Prof. Dr. Stefan Kins (Abt. Humanbiologie, TU Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt.

Für die Analyse der Caspase-Aktivität wurden PC12 Zellen mit steigender Konzentration an Fc-sAPP für 24 h präinkubiert um anschließend den Stress-Stimulus Thapsigargin oder Staurosporin zu applizieren. Für beide Stimuli konnte in Abhängigkeit von Fc-sAPP ein protektiver Effekt verzeichnet werden. Die durch Thapsigargin induzierte Apoptose konnte bereits bei einer Konzentration von 5 nM Fc-sAPP signifikant reduziert werden (Abbildung 5-18 A). Ein dosisabhängiger Effekt zeichnete sich hier, ebenso wie nach Staurosporin-Behandlung, deutlich ab. Auch die durch Staurosporin induzierte Caspase-Aktivität konnte durch eine Konzentration von 5 nM Fc-sAPP signifikant verringert werden (Abbildung

5-18 B). Zusammengefasst zeigt sich hier eine Bestätigung der protektiven Eigenschaft von sAPP α .

5.2.9 6xHis-sAPP α SCHÜTZT HIPPOCAMPALE NEURONEN VOR DER NMDA-SCHÄDIGUNG

Eine weitere Quelle für rekombinantes sAPP α stellte das Expressionssystem *Pichia pastoris* dar. Dieses System ermöglicht durch die einfache Kultivierung von Hefen eine größere Produktionsmenge. Der uns zur Verfügung stehende Hefestamm wurde mit dem Spaltprodukt sAPP α der Isoform APP695 stabil transformiert.

Um das so gewonnene sAPP α auf seine Funktionalität zu testen, sind dissoziierte hippocampale Neuronenkulturen aus Wistar Ratten präpariert worden. Die Primärzellkulturen wurden aus Jungtieren von P0-P1 gewonnen und nach 10 Tagen *in vitro* für die Experimente verwendet. Da die Atrophie des Hippocampus zu einem der gesicherten Diagnosemerkmale der Alzheimer Demenz zählt, stellt die hier verwendete Primärzellkultur eine gute Möglichkeit dar, an physiologisch relevantem Material Untersuchungen durchzuführen.

Das hier verwendete Stress-Modell der NMDA-Schädigung soll als Hilfsmittel für die Untersuchung der protektiven Wirkung von sAPP α verwendet werden. Ebenso wie eine Behandlung mit Thapsigargin zieht die Behandlung mit NMDA einen toxischen Kalziumeinstrom nach sich. Hierbei bindet NMDA als spezifischer Agonist von Glutamat an den ionotropen Glutamatrezeptoren, was einen Kalziumeinstrom induziert. Dabei steht eine Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren und eine damit verbundene Störung der Kalziumhomöostase in neuronalen Zellen in engem Zusammenhang mit der Pathophysiologie von Morbus Alzheimer.

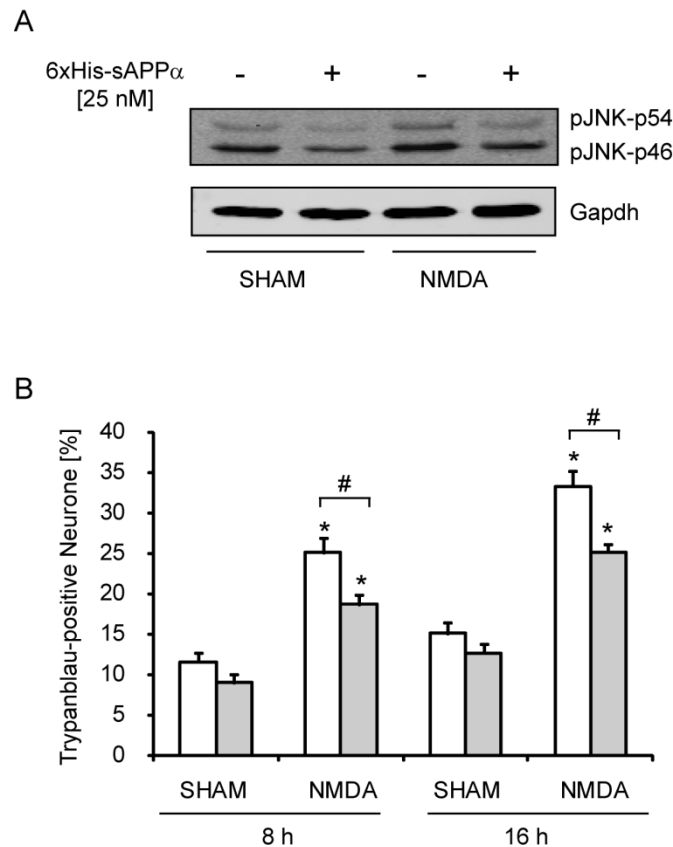


ABBILDUNG 5-19: sAPP α schützt hippocampale Neurone vor einer NMDA-Schädigung. (A) Hippocampale Neurone wurden mit 25 nM sAPP α (+) vorbehandelt. Nach Abschluss der 24stündigen Vorbehandlung wurden die Neurone mit 300 μ M NMDA für 5 min behandelt. Als Kontrolle wurde eine SHAM-Behandlung mitgeführt. 8 h später wurden Gesamtzelllysate hergestellt und auf die Phosphorylierung von JNK im Western Blot untersucht. Gapdh wurde als Ladekontrolle benutzt. (B) Parallel wurden hippocampale Neurone 8 h und 16 h nach der NMDA-Schädigung fixiert und mit Trypanblau gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Trypanblau-positiven Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus ca. 500 ausgezählten Zellen aus $n = 4$ unabhängigen Kulturen. (* $p < 0,05$ wurde als signifikant zur SHAM-Kontrolle eingestuft, # $p < 0,05$ wurde als signifikant unterschiedlich eingestuft)

Die 10 Tage *in vitro* kultivierten hippocampalen Neuronenkulturen wurden mit 25 nM sAPP α für 24 h präinkubiert und anschließend mit einer 300 μ M NMDA-Lösung geschädigt. Als Kontrolle wurde eine SHAM-Lösung angesetzt, der einzig der Bestandteil NMDA fehlte. Die Behandlungslösungen wurden nach 5 min durch einen Mediumwechsel von den Zellkulturen entfernt. 8 h oder 16 h später erfolgte die Analyse der Aktivierung der Stresskinase JNK im Western Blot bzw. die Färbung der Zellen mit Trypanblau. Die Phosphorylierung von JNK, lag nach der sAPP α Vorbehandlung deutlich reduziert vor (Abbildung 5-19 A). Daraus lässt sich eine partielle Inhibition des proapoptotischen JNK-Signalweges durch sAPP α schließen.

Dieser Befund korreliert mit den vorangegangenen Analysen des JNK-Signalweges im PC12-Zellmodell (vgl. 5.1.4, 5.2.7).

Der Farbstoff Trypanblau ist nicht membranpermeabel und kann so nur selektiv in Zellen mit poröser Membran eindringen und dort eine zytosolische Anfärbung verursachen, die es möglich macht geschädigte Neurone von intakten zu diskriminieren. Die Quantifizierung der Trypanblau-Färbung zeigt einen deutlichen Schutz vor Zelltod induziert durch NMDA-Schädigung nach 8 h und 16 h. Dieser protektive Effekt korreliert mit dem verringerten Phosphorylierungsgrad von JNK. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen, kann also eine sAPP α -vermittelte Protektion in hippocampalen Neuronen bestätigt werden.

5.2.10 DIE KURZZEITBEHANDLUNG VON PC12 ZELLEN MIT HOHEN DOSEN AN DHA ERHÖHT DIE ZELL-VIABILITÄT UND SCHÜTZT VOR DEM ZELLTOD

Bisher konnte gezeigt werden, dass DHA in geringen Dosen über einen langen Behandlungszeitraum HEK-APP Zellen vor Zelltod, ausgelöst durch Thapsigargin oder Staurosporin, schützen kann. Für die Untersuchung der zu Grunde liegenden Mechanismen wurden PC12 Zellen hinzugezogen. Für dieses Zellmodell soll im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht werden, ob eine Behandlung mit höheren Konzentrationen über einen kürzeren Zeitraum ebenfalls durch protektive Effekte gekennzeichnet ist. Die erste Analyse bezog sich auf die basale Zellviabilität, die schon für HEK-APP Zellen in Abhängigkeit von DHA als gesteigert (Daten nicht gezeigt) vorgefunden wurde. PC12 Zellen wurden in diesem Ansatz für 24 h mit verschiedenen Dosen (100 μ M bis 250 μ M) an DHA vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des MTT-Reagenz, welches von metabolisch aktiven Zellen zu Formazan umgesetzt werden kann. Die Vermessung der optischen Dichte des solubilisierten Formazan-Salzes kann als Korrelat für die Viabilität der Zellen bewertet werden. Für eine höhere metabolische Aktivität wird eine höhere Viabilität der Zellen zu Grunde gelegt.

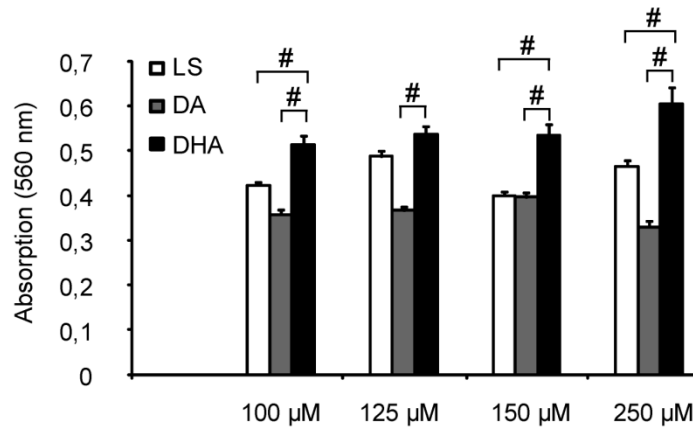


ABBILDUNG 5-20: Eine Kurzzeitbehandlung mit DHA erhöht die basale Viabilität von PC12 Zellen. PC12 Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlich hohen Dosen an Fettsäuren behandelt. Neben DHA-Liposomen (DHA) wurden als Kontrolle leere Liposomen (LS) und DA-Liposomen verwendet. Nach Ende der Behandlung erfolgte die Bestimmung der Viabilität durch den MTT-Assay. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 8$ unabhängigen Kulturen (# $p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft).

Die Behandlung mit DHA resultierte in einer geringfügigen dosisabhängigen Steigung der Viabilität. Die Behandlung mit DA-Liposomen zeigte nur geringe Schwankungen in ihrer Auswirkung auf die Viabilität der behandelten Zellkulturen. Zwischen DHA und der komplett gesättigten Docosansäure besteht in allen verwendeten Konzentrationen ein signifikanter Unterschied (Abbildung 5-20). Es kann resümiert werden, dass die Behandlung mit DHA-Liposomen zu einer signifikant gesteigerten Viabilität der PC12 Zellen führt.

Im Folgenden soll untersucht werden, ob die hier gezeigten, viabilitätssteigernden Effekte in Protektionsstudien wieder zu finden sind. Zu diesem Zweck sind PC12 Zellen mit unterschiedlichen Dosen präinkubiert worden, um anschließend entweder mit Thapsigargin oder mit Staurosporin behandelt zu werden. Die Analyse der Caspase-Aktivität soll Aufschluss darüber geben, ob eine eventuelle Protektion in Abhängigkeit der DHA-Behandlung vorliegt.

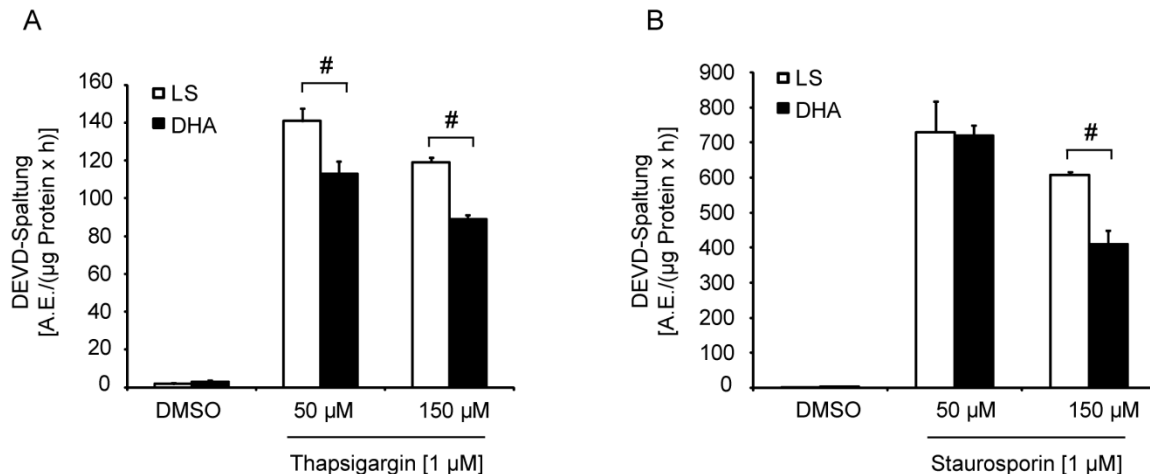


ABBILDUNG 5-21: Eine Kurzzeitbehandlung mit DHA schützt PC12 Zellen vor Apoptose. PC12 Zellen wurden für 24 h mit 50 µM oder 150 µM Leer-Liposomen (LS) oder DHA-Liposomen präinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit (A) Thapsigargin (1 µM) für 16 h oder mit (B) Staurosporin (1 µM) für 6 h. Als Kontrolle wurden Kulturen mit DMSO behandelt. Die Analyse der Caspase-Aktivität erfolgte über die Zugabe des fluorogenen DEVD-AMC Substrates (10 µM). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. (# $p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft; A.E. = arbiträre Einheiten)

PC12 Zellen, die mit DHA vorbehandelt wurden, zeigten für beide Dosen einen signifikanten Schutz vor Zelltod, der durch Ca^{2+} -Freisetzung ausgelöst wurde. Die Caspase-Aktivierung durch Behandlung mit Staurosporin konnte durch 150 µM DHA-Behandlung deutlich reduziert werden. In Zusammenhang mit der Bestimmung der Zellviabilität konnte für eine Kurzzeitbehandlung mit hohen Dosen an DHA ähnliche Ergebnisse erzielt werden wie für die Langzeitbehandlung mit niedrigen Dosen.

5.2.11 KOMPLEXIERUNG VON DHA AN BSA - EINE ALTERNATIVE ZU TRANSFER-LIPOSOMEN

Die Komplexierung von DHA an BSA (*bovines serum albumine*) erfolgte über die Herstellung einer 5 mM Stocklösung von DHA in PBS, dem 0,1% fettfreies BSA zugesetzt wurde. Es soll getestet werden, ob die Komplexierung eine weitere Möglichkeit einer effektiven Aufnahme der Fettsäuren in die Zellen darstellt. Dafür sind Protektionsstudien unter Thapsigargin-Stress und Staurosporin-Stress verwirklicht worden. Das gewählte PC12-Zellmodell zeigte in Kurzzeitbehandlung mit hohen Dosen an DHA eine Protektion vor Ca^{2+} -Freisetzung induziert durch Thapsigargin. Des Weiteren konnte über die Verpackung von DHA in Liposomen ein Schutz vor Staurosporin-induzierter Apoptose verzeichnet werden (vgl. Abbildung 5-21). Eine

Überprüfung dieser Ergebnisse durch eine Vorbehandlung mit der BSA-DHA-Komplexierung wurde analog dazu bewerkstelligt.

In der Analyse der Caspase-Aktivierung wurde parallel zur Präinkubation mit BSA-DHA ein Ansatz nur mit BSA mitgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Komplexierung von DHA mit BSA erfolgreich Apoptose reduzieren kann. Dieser Befund konnte unter Thapsigargin-Stress durchgängig für alle verwendeten DHA-Konzentrationen gezeigt werden (Abbildung 5-22 A). Die durch Staurosporin induzierte Apoptose konnte erst durch die beiden hohen Dosen an DHA (150 μ M, 250 μ M) signifikant reduziert werden (Abbildung 5-22 B).

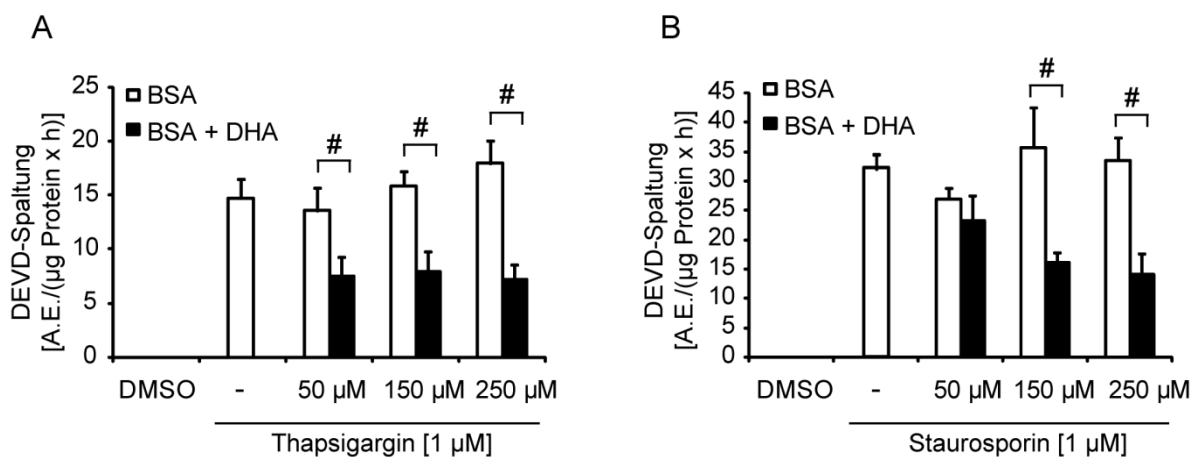


ABBILDUNG 5-22: Die Komplexierung von DHA an BSA schützt PC12 Zellen vor Apoptose. PC12 Zellen wurden für 24 h mit DHA-BSA-Lösung (BSA + DHA) in ansteigender Konzentration inkubiert. Als Kontrolle wurde eine 0,1%ige BSA Lösung in PBS für die Präinkubation mitgeführt (BSA). Nach Abschluss der Präinkubation wurden die Stress-Stimuli (A) Thapsigargin (1 μ M) für 16 h bzw. (B) Staurosporin (1 μ M) für 6 h appliziert. Als Lösungsmittelkontrolle wurden DMSO-Kulturen mitgeführt. Die Analyse der Caspase-Aktivität erfolgte über die Zugabe des fluorigenen DEVD-AMC Substrates (10 μ M). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ unabhängigen Experimenten. (# $p < 0,05$ wurde als signifikant eingestuft; A.E. = arbiträre Einheiten)

Zusammengenommen kann festgestellt werden, dass die Komplexierung von DHA an BSA eine alternative Möglichkeit darstellt, die Aufnahme von Fettsäuren *in vitro* zu begünstigen. Die Ergebnisse korrelieren mit den Protektionsstudien, die mit Liposomen angefertigt wurden.

6 DISKUSSION

Das Amyloid-Precursor-Protein unterliegt einer proteolytischen Spaltung, die sich in zwei Hauptprozessierungswege unterteilen lässt. Der sogenannte nicht-amyloidogene Prozessierungsweg ist charakterisiert durch die sequenzielle Spaltung von APP durch α - und γ -Sekretase. Hierbei liefert der erste Schnitt durch die α -Sekretase in der Ektodomäne des Transmembranproteins das Spaltprodukt sAPP α . Die Schnittstelle der α -Sekretase liegt innerhalb der A β -Sequenz, was die Generierung des toxischen A β -Peptides unterbindet. Dahingegen resultiert die amyloidogene APP-Prozessierung durch β -Sekretase und γ -Sekretase genau in diesem Fragment, welches als eines der Hauptkomponenten der Plaques im Alzheimer Gehirn identifiziert werden konnte (Hartley et al., 1999; LaFerla et al., 2007). Beiden Prozessierungswegen ist im zweiten Schritt die Spaltung durch die γ -Sekretase gemein. Während A β , als toxischer Bestandteil des APP, in der Amyloid β -Kaskade eine zentrale Rolle zugeschrieben wird, sind für sAPP α neurotrophe und neuroprotektive Eigenschaften bekannt (Mattson, 1997; Zheng and Koo, 2011).

In vitro Studien konnten belegen, dass sAPP α neuroprotektiv gegen zellulären Stress wirkt. So konnte ein Schutz vor Zelltod durch Hypoglykämie in neuronalen Zellkulturen beobachtet werden (Mattson et al., 1993b). Des Weiteren konnte ein Schutz vor toxischen Ca²⁺-Spiegeln in hippocampalen Neuronen belegt werden (Barger and Mattson, 1996). Furukawa und Kollegen konnten Hinweise für eine Protektion vor Glutamat- bzw. A β -induzierter Toxizität geben (Furukawa et al., 1996b). Dies konnte *in vivo* für A β -induzierte Toxizität ebenfalls im Mausmodell nachgewiesen werden (Stein et al., 2004). Darüber hinaus ergaben *in vitro* Studien, dass Zellen, die APP überexprimieren, potent vor genotoxischem Stress und ER-Stress geschützt sind (Kögel et al., 2005; Kögel et al., 2003). Weitere *in vivo* Studien bestätigten die neuroprotektive Eigenschaft von sAPP α . Dem zu Folge resultierte die Applikation von sAPP α in einer Apoptose-Reduktion in neuronalen Zellen (Thornton et al., 2006).

Im Zuge dieser Arbeit sollten die neuroprotektiven Eigenschaften von APP, welche maßgebend durch sAPP α vermittelt werden, in unterschiedlichen Schädigungsmodellen untersucht werden. Zu Grunde lag hierbei die Hypothese, dass der Verlust der physiologischen neuroprotektiven Funktion von APP/sAPP α einen wesentlichen Faktor zur Alzheimer-Ätiologie darstellt. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob durch den Einbau von Omega-3 Fettsäuren in die Zellmembran eine Erhöhung der nicht-amyloidogenen

Prozessierung von APP mit einer daraus resultierenden erhöhten Bildung von sAPP α erzielt werden kann und ob dies in einem Schutz vor Stress-induziertem Zelltod resultiert.

6.1 sAPP α WIRKT NEURONALEM ZELLTOD INDUZIERT DURCH PROTEASOMALEN STRESS ENTGEGEN

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die neuroprotektiven Eigenschaften von sAPP α unter Epoxomicin-induziertem proteasomalem Stress untersucht. Hierbei wurden als Zellmodell neuronale PC12 Zellen verwendet. Zur Untersuchung der neuroprotektiven Eigenschaften von sAPP α wurden konditionierte Überstände aus APP695 überexprimierenden HEK Zellen und aufgereinigtes rekombinantes sAPP α aus COS7 Zellen oder *Pichia pastoris* verwendet, um eine exogene Gabe von sAPP α zu ermöglichen.

6.1.1 sAPP α -PRODUKTION IN HEK ZELLEN

Um die sAPP α -vermittelte Protektion unter proteasomalen Stressbedingungen zu untersuchen, wurden konditionierte Überstände von APP695 überexprimierenden HEK Zellen (HEK-APP) verwendet (Citron et al., 1992, Haass et al., 1992). Hierfür wurden diese Zellen zuerst auf ihre intrazelluläre APP-Expression hin analysiert. Darauf erfolgte eine Quantifizierung des in den Überstand sezernierten sAPP α , um sicherzustellen das ausreichende Mengen sekretiert werden. Da die verwendeten Überstände außer sAPP α auch Medium und andere von den Zellen sekretierte Faktoren enthalten, wurden untransfizierte HEK Zellen für die Produktion eines Kontrollüberstandes herangezogen. Zur Unterscheidung von sAPP α -haltigen Überständen und aufgereinigtem, rekombinantem sAPP α im Versuchsaufbau wurde die Verwendung von HEK-APP Überständen mit sAPP bezeichnet.

Für die Behandlung der PC12 Zellen mit dem Kontrollüberstand von untransfizierten HEK Zellen konnte keinerlei protektiver Effekt festgestellt werden. Vergleichende Untersuchungen mit aufgereinigtem sAPP α und konditionierten HEK-APP Überständen erzielten ähnliche protektive Effekte. Daraus schlussfolgernd, kann als zytoprotektiver Bestandteil der Überstände sAPP α deklariert werden. In parallel durchgeführte Studien wurden organotypische Schnittkulturen mit den gleichen Präparationen an konditioniertem Medium,

ohne dass eine Stress-Induktion durch Epoxomicin-Behandlung erfolgte, inkubiert (Copanaki et al., 2010). Durch diese Analysen konnte ein toxischer Effekt durch den Überstand ausgeschlossen werden.

6.1.2 sAPP α VERMITTELTE PROTEKTIVE FUNKTIONEN DES AMYLOID-PRECURSOR PROTEINS

Mehrere Studien konnten belegen, dass sAPP α neuroprotektive und neurotrophe Eigenschaften besitzt (Bell et al., 2008; Furukawa et al., 1996b; Kögel et al., 2005; Kögel et al., 2003; Luo et al., 2001a; Schubert and Behl, 1993). So ist z.B. bekannt, dass sAPP α einer zytotoxischen Glutamat-induzierten Kalzium-Erhöhung entgegen wirken kann und Neurone dadurch vor dem Zelltod geschützt werden (Barger and Mattson, 1995). Ferner konnte für sAPP α belegt werden, dass es A β -induzierte Erhöhungen des Ca²⁺-Spiegel ausgleichen kann (Goodman and Mattson, 1994). Des Weiteren postulieren viele Studien eine neuroprotektive Eigenschaft unter Bedingungen von zellulärem Stress (Furukawa et al., 1996b; Kögel et al., 2005; Kögel et al., 2003; Mattson, 1997; Small, 1994). Außerdem konnte eine verringerte neuronale Apoptose nach einer traumatischen Hirnschädigung durch Applikation von sAPP α nachgewiesen werden (Thornton et al., 2006). Furukawa und Kollegen konnten in diesem Kontext Hinweise dafür liefern, dass sAPP α um das 100fache potenter als das geringfügig kürzere APP-Fragment sAPP β bezüglich der beobachteten Protektion ist (Furukawa et al., 1996b). Einen Hinweis auf die spezifische, neuroprotektive Domäne erbrachte die Behandlung mit Heparinase, die die protektiven Effekte durch sAPP α aufheben konnte. Schlussfolgernd wurde für die Heparinbindestelle (AS607-612), die am C-terminalen Bereich von sAPP α lokalisiert ist und dementsprechend dem APP-Fragment sAPP β fehlt, eine Beteiligung an der Vermittlung der Protektion vermutet (Furukawa et al., 1996b). In diesen Kontext reiht sich eine erst vor kurzem von Corrigan und Kollegen durchgeführte Studie ein, in der Hinweise für eine Vermittlung der Protektion durch zwei funktionelle Domänen geliefert werden. Auch hier wird die Beteiligung der Heparinbindestellen vermutet. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien wurde hier nicht zwischen den beiden Ektodomänen sAPP α und sAPP β differenziert, da beide angesprochenen funktionellen Domänen sowohl in sAPP α als auch in sAPP β vorhanden sind (Corrigan et al., 2011). Eine dieser Domänen gehört zur E1-Region und bezeichnet die Peptidsequenz APP28-123, welche eine Wachstumsfaktor ähnliche Domäne (GFLD, *growth factor like domain*) beinhaltet (Abbildung 1-4). Das zweite verwendete protektiv-wirkende Peptid (APP316-498) stellt die E2-Domäne dar und beinhaltet ein Pentapeptid-Motiv

„RERMS“, welches in Fibroblasten eine Wachstums-regulierende Funktion von APP vermittelt (Ninomiya et al., 1993). Dennoch legen die überwiegende Mehrheit an Studien nahe, dass die neuroprotektive Eigenschaft von APP durch sAPP α und nicht durch sAPP β vermittelt wird (Furukawa et al., 1996b, Barger and Mattson, 1995, Goodman and Mattson, 1994, Thornton et al., 2006, Wehner et al., 2004). Eine abschließende Beantwortung der Frage nach der spezifischen, protektiven Domäne kann momentan noch nicht gegeben werden. Unterstützend konnte im Kontext dieser Arbeit für sAPP β keinerlei Schutz vor proteasomalem Stress dokumentiert werden, wobei für sAPP α ein protektiver Effekt bestätigt werden konnte.

Zur Etablierung der neuroprotektiven Wirkung von sAPP α wurde zunächst im Kontext dieser Arbeit untersucht, ob sAPP α einer Glutamat-induzierten toxischen Störung der Kalziumhomöostase entgegenwirken kann. Hierfür wurde das bekannte Modell der NMDA-Schädigung herangezogen. NMDA bindet hierbei an ionotrope Glutamatrezeptoren, deren Öffnung in einem toxischen Kalziumeinstrom resultiert. In Übereinstimmung mit einer frühen Studie (Furukawa and Mattson, 1998) konnte durch eine Präinkubation mit rekombinanten aus *Pichia pastoris* aufgereinigtem sAPP α eine Protektion etabliert werden.

6.1.3 sAPP α SCHÜTZT NEURONALE PC12 ZELLEN VOR STRESS DURCH MODULATION DES PRO-APOPTOTISCHEN JNK-SIGNALWEGES UND DES ANTI-APOPTOTISCHEN PI3K/AKT SIGNALWEGES

Ein pro-apoptotischer Stimulus, der zur Pathologie der Alzheimer Krankheit beiträgt, ist proteasomaler Stress und sollte im ersten Teil der Arbeit durch den Einsatz eines Proteasom-Inhibitors untersucht werden (Keller et al., 2000; Song and Jung, 2004). Es ist bekannt, dass das Proteasom eine wichtige Rolle innerhalb der Proteinqualitätskontrolle (PQC, *protein quality control*) einnimmt, und dass eine proteasomale Dysfunktion die Akkumulation von fehlgefalteten oder oxidierten Proteinen nach sich zieht. Im Kontext der Alzheimer Krankheit wird vermutet, dass oligomere A β -Aggregate die Funktion des Proteasoms stören können und dadurch die Hyperphosphorylierung von Tau und die Generierung von intrazellulären neurofibrillären Bündeln initiiert werden (Mandelkow, 1999; Oddo et al., 2004; Oddo et al., 2008; Tseng et al., 2008). Die Verwendung des Proteasom-Inhibitors Epoxomicin ermöglichte in der vorliegenden Arbeit die Modellierung eines pathophysiologischen Aspekts, der zur Alzheimer Krankheit beiträgt, und darüber hinaus die Untersuchung der protektiven Eigenschaften von sAPP α in diesem Kontext. Für PC12 Zellen

und für organotypische hippocampale Schnittkulturen konnte eine Protektion durch sAPP α vor proteasomalem Stress beobachtet werden. Der Befund konnte durch die Quantifizierung der Effektorcaspasen-Aktivität im Caspase-Assay und durch lichtmikroskopische Analysen der Kernfragmentierung in PC12 Zellen validiert werden. Zusammenfassend kann für sAPP α ein Schutz vor Apoptose, induziert durch proteasomalen Stress, deklariert werden.

Die der Protektion zu Grunde liegenden Mechanismen sind derzeit noch unklar. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch bereits ein Einfluss auf den pro-apoptotischen JNK-Signalweg nachgewiesen werden (Kögel et al., 2005). Darüber hinaus ist eine direkte Korrelation zwischen einer erhöhten JNK-Expression und der Alzheimer Krankheit bekannt. Belege gaben immunhistochemische Analysen, die eine erhöhte JNK-Expression in *post mortem* Gehirngewebe, mit neurofibrillären Bündeln oder Hirano-Körperchen assoziiert (Zhu et al., 2001), vorgefunden haben. Im Vergleich dazu konnte in *post mortem* Gehirngewebsschnitten von gesunden Probanden nur eine geringe JNK-Expression und eine diffus zytoplasmatische Verteilung nachgewiesen werden (Zhu et al., 2001). Des Weiteren ist bekannt, dass die Aktivierung von JNK zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren führt, die den apoptotischen Prozess kontrollieren (Dhanasekaran and Reddy, 2008) und dadurch zu Zelltod in multiplen neurodegenerativen Erkrankungen führen (Bogoyevitch et al., 2004). Der JNK-Signalweg kann ebenso über A β aktiviert werden (Morishima et al., 2001) und die Phosphorylierung von APP beeinflussen, was sich wiederum auf die Produktion von A β auswirkt (Colombo et al., 2009; Colombo et al., 2007). Eine Assoziation der Aktivierung und Distribution von JNK scheint demnach mit der Pathologie der Alzheimer Krankheit gegeben zu sein. Eine weitere, erst kürzlich erschienene Studie stützt diese Annahme. Braithwaite und Kollegen konnten belegen, dass die Inhibition des JNK-Signalweges in einem Alzheimer Modell zur Protektion vor A β -induziertem Zelltod führt (Braithwaite et al., 2010).

Diesem Ansatz folgend wurde die Aktivierung des JNK-Signalweges in beiden Schädigungsmodellen in Anwesenheit von sAPP α analysiert. Das hier verwendete sAPP α -haltige konditionierte Medium bewirkte in der Kontrollbehandlung der PC12 Zellen mit DMSO bereits eine verringerte Aktivierung des Stress-Signalweges. Durch die Induktion von Stress ließ sich der Nachweis einer erhöhten Aktivierung erbringen. Diese konnte in Abhängigkeit von sAPP α stark reduziert werden, was darauf schließen lässt, dass sAPP α den JNK-Signalweg partiell inhibieren kann. Die Implementierung eines weiteren Stress-Stimuli (UV-Strahlung) und die sAPP α -abhängige Reduktion der JNK-Aktivierung nach UV-Strahlung lassen vermuten, dass sAPP α , unabhängig vom JNK-induzierenden Stimulus, inhibierend auf diesen Signalweg einwirkt. Doch der Grad der Inhibition differiert je nach

Stimulus. Möglich wäre ein inhibitorischer Effekt von sAPP α auf MLK3 (*mixed-lineage kinase 3*), was wiederum in einer Inhibition der JNK-Signalkaskade resultieren könnte, da diese als vorgeschaltete Kinasen JNK aktivieren können (Kögel et al., 2005).

Unterstützende Ergebnisse erzielten Versuche, in denen zusätzlich ein spezifischer JNK-Inhibitor verwendet wurde. Die Applikation des Inhibitors BI78D3 bewirkte eine Reduktion der Caspase-Aktivität in PC12 Zellen, die mit Epoxomicin behandelt wurden. In PC12 Zellen, die mit Kontrollüberständen behandelt wurden, imitierte die zusätzliche Behandlung mit dem JNK-Inhibitor den protektiven sAPP α -bedingten Effekt. In den Kulturen, die mit sAPP α -haltigen Überständen und dem JNK-Inhibitor behandelt wurden, konnte eine verringerte Protektion beobachtet werden. Zusammengenommen bestätigten diese Ergebnisse die Annahme einer protektiven Funktion von sAPP α durch eine Inhibition des JNK-Signalweges. Diese Befunde bestätigen die Annahme, dass sAPP α einen generellen anti-apoptotischen Effekt ausübt und im Stande ist diverse JNK-aktivierende Stress-Stimuli zu antagonisieren. Zusammengenommen unterstützen diese Daten die potentielle physiologische Funktion von sAPP α bei der Vermittlung der Neuroprotektion.

Ein neuroprotektiver Signalweg, der über viele neurotrophe Zytokine aktiviert werden kann, ist der PI3K/Akt Signalweg. Dieser Signalweg kann u.a. über die Phosphorylierung einer stromaufwärts gelegenen Kinase (MLK3) modulierend auf den Stress-responsiven JNK Signalweg einwirken (Barthwal et al., 2003). Eine mögliche Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges durch sAPP α könnte demnach ebenfalls eine Inhibition des JNK-Signalweges bewirken. Darüber hinaus bewirkt die Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges die Phosphorylierung von BAD, welches daraufhin sogenannte 14-3-3 Proteine bindet, was dadurch zur Freisetzung von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-xl oder Bcl2 führt, welche Caspasen inhibieren können und somit Apoptose hemmend wirken.

Zur Untersuchung des PI3K/Akt Signalweges wurde der spezifische Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitor LY296002 verwendet (Vlahos et al., 1994). Der Einsatz des Inhibitors konnte die sAPP α -vermittelte Protektion vor Epoxomicin-induzierter Apoptose weitestgehend aufheben. Eine konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges in Abwesenheit von sAPP α scheint darüber hinaus gegeben zu sein, da die Applikation des Inhibitors in einer erhöhten Caspase-Aktivierung nach proteasomalem Stress resultiert. Im zweiten Schädigungsmodell mit Thapsigargin zeigte die Verwendung des Inhibitors ähnliche Ergebnisse. Die Protektion durch sAPP α -haltige konditionierte Überstände konnte durch zusätzliche Gabe des Inhibitors zum größten Teil aufgehoben werden.

Außerdem konnten Hinweise für eine mögliche Beteiligung des NF- κ B Signalweges in der Vermittlung des neuroprotektiven Effekts durch sAPP α gegeben werden. In einer Studie von Barger und Mattson wurde gezeigt, dass sAPP α in der Lage ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu induzieren. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors resultiert in der Translokation der Untereinheiten in den Nukleus, wo er die Genexpression von zytoprotektiven Genen wie z.B. MnSOD (*Mangan Superoxid-Dismutase*) reguliert. Für den NF- κ B Signalweg selbst gibt es Hinweise, dass er übergeordnet durch den PI3K/Akt Signalweg reguliert wird (Cheng et al., 2002) und dadurch vermutlich die neuroprotektive Wirkung von sAPP α potenziert werden könnte. Des Weiteren konnte bei einer Überexpression von APP eine Inhibition des Zielgenes c-Jun gezeigt werden, die mit einer potenten Reduktion der JNK-Aktivität einherging (Kögel 2005). Darüber hinaus konnte belegt werden, dass die Inhibition von c-Jun ebenfalls zu einer erhöhten Expression von MnSOD führen kann (Holzberg et al., 2003). Dieser Sachverhalt lässt neben der potentiellen Involvierung des NF- κ B Signalweges vermuten, dass die APP-abhängige Aktivierung von MnSOD auch durch die Inhibition des JNK-Signalweges verursacht werden könnte. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 eine sAPP α -induzierte Protektion aufheben kann, was auf eine Beteiligung dieses weiteren Überlebens-Signalweges in der Vermittlung des sAPP α -abhängigen Schutzes vor Glutamat-induziertem Zelltod schließen lässt (Cheng et al., 2002).

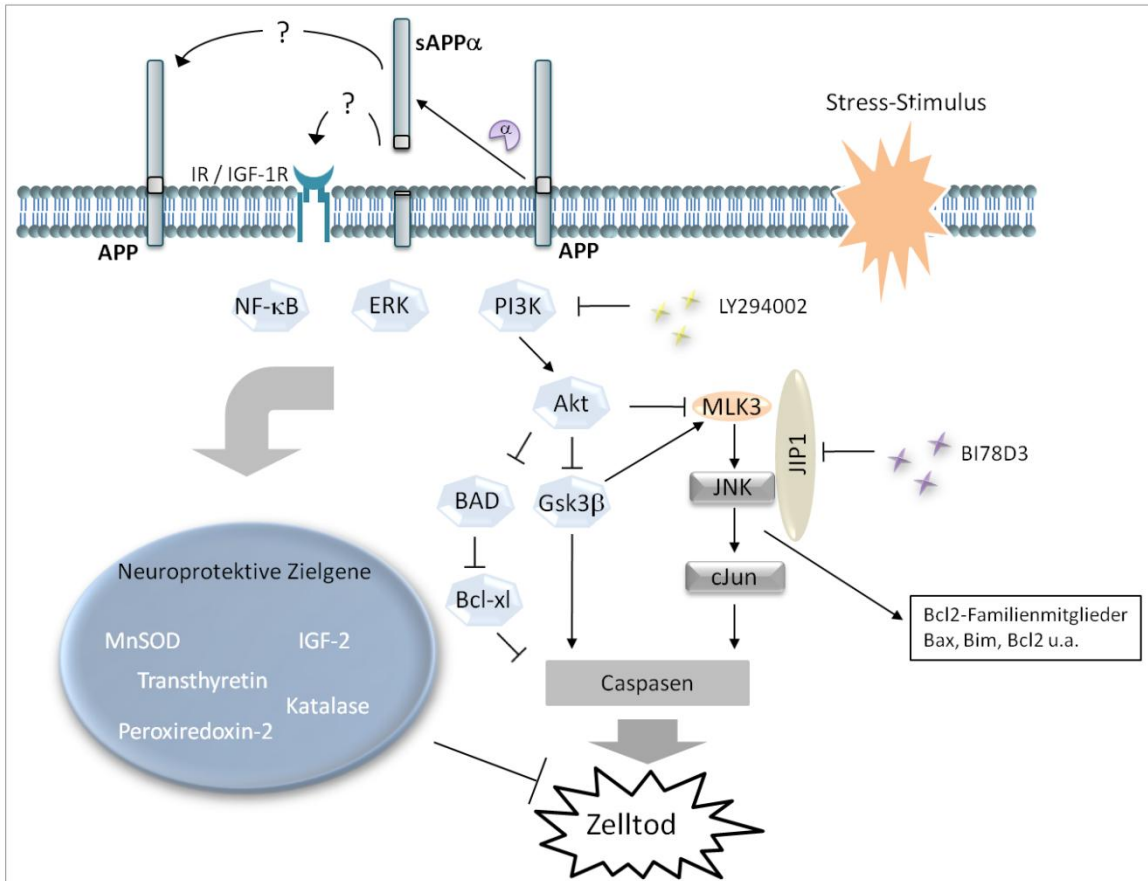


ABBILDUNG 6-1: Mögliche Mechanismen der sAPP α -vermittelten Protektion.

(Erklärung siehe Text)

Durch Microarray-Analysen konnten eine Reihe in Abhängigkeit von sAPP α /APP differentiell regulierte zytoprotektive Gene identifiziert werden, deren Funktion im Kontext der neuroprotektiven Eigenschaften von APP/sAPP α diskutiert werden. Zu den identifizierten Genen gehören Transthyretin, IGF-2 (*insulin-like growth factor-2*), Peroxiredoxin-2, Katalase und MnSOD (Kögel et al., 2005; Stein et al., 2004).

In den Microarray-Analysen von Stein und Kollegen konnte belegt werden, dass Transthyretin (TTR) und IGF-2 durch sAPP α reguliert werden. Transthyretin ist in der Lage A β *in vitro* (Schwarzman et al., 1994) und *in vivo* (Tsuzuki et al., 2000) zu binden und somit der Bildung von A β -Aggregaten zu entziehen. Im Alzheimer-Mausmodell konnten nach Bindung von TTR mittels eines spezifischen Antikörpers erhöhte A β -Level, Tau-Phosphorylierung, Apoptose und der Verlust von Neuronen verzeichnet werden (Stein et al., 2004). Dies lässt auf eine physiologische Funktion von TTR in der Bindung von A β und der Verhinderung der Akkumulation von A β schließen. sAPP α könnte demnach durch die Induktion einer verstärkten TTR-Genexpression protektiv wirken.

Ebenso konnte für IGF-2 eine durch sAPP α gesteigerte Expression dokumentiert werden. Für IGF-2 wird vermutet, dass es durch die Bindung an den IGF-1-Rezeptor möglicherweise den anti-apoptotischen PI3K/Akt Signalweg aktiviert. Darüber hinaus zeigten die Analysen von Stein und Kollegen eine sAPP α -abhängige Regulation von Peroxiredoxin-2, ein Protein welches als Peroxidase eine anti-oxidative Funktion erfüllt. In diesem Zusammenhang wurden in Abhängigkeit einer APP-Überexpression weitere anti-oxidative Gene wie MnSOD und Katalase als Zielgene von APP identifiziert (Kögel et al., 2005). Eine Möglichkeit über die sAPP α MnSOD hochregulieren könnte, bietet der schon zuvor angesprochene NF- κ B Signalweg, für den bereits gezeigt werden konnte, dass sAPP α über diesen seine neuroprotektive Eigenschaft entfalten könnte (Barger and Mattson, 1996). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass MnSOD zuvor schon als etabliertes Zielgen von NF- κ B identifiziert werden konnte (Xu et al., 1999).

Für die Mechanismen der sAPP α -abhängigen Neuroprotektion wird u.a. die Beteiligung möglicher Rezeptoren von sAPP α diskutiert. Hierzu zählen der Insulin-Rezeptor, der IGF1-Rezeptor und das membranständige Holo-APP.

In diesem Zusammenhang konnten Jimenez und Kollegen Hinweise dafür geben, dass sAPP α , möglicherweise modulierend über den IGF1-Rezeptor und/oder Insulin-Rezeptor, den PI3K/Akt Signalweg aktiviert. Die dadurch verursachte Phosphorylierung von GSK3 β resultiert in einer Inaktivierung dieser Kinase, wodurch in letzter Konsequenz ein neuroprotektive Einfluss ausgeübt wird (Jimenez et al., 2011). Für oligomere A β -Aggregate wird ein diametraler entgegengesetzter Effekt postuliert. Der hier beschriebene Rezeptor-vermittelte Signalweg ist bekannt für Neurotrophine wie NGF (*nerve growth factor*) und BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) sowie IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) und Insulin, welche kritische Faktoren für neuronales Überleben und neuronale Plastizität, Lernen und Gedächtnisleistung darstellen (Ernfors and Bramham, 2003; Thoenen, 1995; Tropea et al., 2006). Hierbei begünstigen Neurotrophine neuronales Überleben größtenteils über die Aktivierung des anti-apoptotischen PI3K/Akt Signalweges (Bondy and Cheng, 2004). Defekte und Veränderungen der Expression in den IGF-Rezeptor- bzw. Insulin-Rezeptor-Signalwegen konnten außerdem in Zusammenhang mit der Entwicklung der Alzheimer Krankheit gebracht werden (Schulte-Herbruggen et al., 2008). Dokumentiert sind Assoziationen mit den pathologischen Erscheinungen der Amyloid- β Plaques und neurofibrillären Bündeln (Cole and Frautschy, 2007).

Eine weitere mögliche Hypothese zur Vermittlung der sAPP α -abhängigen Neuroprotektion besteht über eine potentielle Bindung von sAPP α an APP, die höchstwahrscheinlich durch

die Heparinbindstellen vermittelt wird. Das hypothetische Modell von Gralle und Kollegen postuliert, dass dabei die prinzipiell pro-apoptotisch wirkenden APP-Homodimere aufgelöst werden und holo-APP als direkter potentieller Rezeptor kompetitiv von sAPP α gebunden wird (Gralle et al., 2009). Die Initiation von Apoptose durch die Homodimerisierung von APP basiert u.a. auf Befunden von Rohn und Kollegen, die eine Aktivierung von APP mit nachfolgender Caspase-Aktivierung durch eine Präinkubation mit einem spezifischen APP-Antikörper (22C11) induzieren konnten (Rohn et al., 2000). Analog zur APP-Dimerisierung wird durch die Bindung des Antikörpers an den Oberflächenrezeptor APP die Auslösung einer Signalkaskade forciert, die in neuronalem Zelltod resultiert. Ein möglicher Mechanismus, wie neuronaler Zelltod über die Antikörper-Bindung an holo-APP initiiert wird, zeigen Hashimoto und Kollegen. Die Autoren beschreiben, dass der Bindung des Antikörpers an holo-APP möglicherweise die Aktivierung eines G-Proteins (G_0) folgt, deren Untereinheit $G_{\alpha 0}$ an APP bindet, während die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit JNK aktiviert, was letztendlich in neuronalem Zelltod kulminiert (Hashimoto et al., 2003). In Vorarbeiten aus dem eigenen Labor konnten Hinweise für eine Protektion durch die Inhibition des JNK-Signalweges gegeben werden. Da JIP-1 an APP bindet und JNK-inhibierend wirkt, liegt die Vermutung nahe, dass diese Interaktion mit APP den JNK-Signalweg regulieren könnte. Nicht publizierte Arbeiten aus dem eigenen Labor bestätigen zum Teil diese Hypothese. So ergaben Protektionsstudien an Neuroblastomzellen, die für APP defizient waren, erste Hinweise für eine Abhängigkeit zwischen der sAPP α -vermittelten Protektion und der Expression von membranständigem holo-APP (nicht publizierte Daten, Diplomarbeit Andreas Zymny 2010).

Die Rolle von holo-APP wird ebenfalls kontrovers diskutiert. In Ergänzung zu den möglichen pro-apoptotischen Effekten, spielt holo-APP möglicherweise selbst auch eine direkte Rolle für die Neuroprotektion. So scheint eine Aktivierung des anti-apoptotischen Signalweges über ERK1/2 möglich. Es wird angenommen, dass die Aktivierung von ERK1 und ERK2 über eine Interaktion zwischen APP/AICD und GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) realisiert wird (Nizzari et al. 2006). Hierbei wird vermutet, dass der Phosphorylierungsstatus von APP und die Prozessierung von APP ausschlaggebend für eine Interaktion zwischen GRB2 und APP sind.

Eine weitere Möglichkeit der APP-abhängigen Regulation von Apoptose ergibt sich über die kompetitive Bindung von APP bzw. sAPP α an Integrine (Young-Pearse et al., 2008), da für Integrine eine Funktion in der Zelladhäsion und Signaltransduktion bekannt ist. Beide Mechanismen stehen eng mit der Regulation der Apoptose in Verbindung. So werden in adhärenz Zellen massiv Überlebenssignale über Integrine vermittelt, welche die Zellen vor zytotoxischen und sonstigen Apoptose-induzierenden Stimuli schützen können. Dies erfolgt

über die Inhibition pro-apoptotischer Stimuli und die Aktivierung von anti-apoptotischen Proteinen (Grossmann, 2002). Die Bindung von APP/sAPP α an Integrine stellt demnach einen weiteren denkbaren Weg dar, über den sich die protektive Eigenschaft entfalten kann.

Zusammenfassend kann für die Vermittlung der neuroprotektiven Wirkung von sAPP α nicht ein einziger Signalweg verantwortlich gemacht werden. Eher kann man nach dem derzeitigen Stand der Dinge von einem pleiotropen Effekt von sAPP α auf verschiedene Überlebens-Signalwege und Stress-Signalwege, die in einem komplexen System zueinander stehen, ausgegangen werden (Abbildung 6-1).

Im Gegenzug zu sAPP α weist sAPP β , ein weiteres APP-Spaltprodukt, keine protektiven Eigenschaften auf (Furukawa et al., 1996b), obgleich es sich nur durch 17 Aminosäuren von sAPP α unterscheidet. Die im Zuge dieser Arbeit erlangten Ergebnisse bestätigen die protektive Funktion von sAPP α und unterstützen die Befunde, dass sAPP β keine Protektion vermitteln kann. Darüber hinaus konnten Nikolaev und Kollegen Hinweise dafür geben, dass sAPP β bzw. ein N-terminales Teilfragment von sAPP β (N-APP), das durch eine weitere proteolytische Spaltung durch eine unbekannte Protease generiert wird, Caspase-abhängige Neurodegeneration vermittelt. Als potentielle Rezeptoren für N-APP werden DR6 (*Death Receptor 6*) oder p75NTR (*p75 neurotrophine receptor*) vermutet (Nikolaev et al., 2009).

6.1.4 sAPP α SCHÜTZT NEURONALE ZELLEN VOR PROTEASOMALEM STRESS

Zur Validierung der bisher gezeigten Experimente in neuronalen PC12 Zellen wurden in Kooperation mit dem Institut für Klinische Neuroanatomie (Dr. Senkenbergische Anatomie, Goethe-Universität Frankfurt) als zusätzliches Modell organotypische hippocampale Schnittkulturen hinzugezogen (Copanaki et al., 2010). Dieses *ex vivo* Modellsystem ermöglichte Studien an maturen Neuronen in einer organotypischen Umgebung (Del Turco and Deller, 2007; Frotscher et al., 1995; Gahwiler et al., 1997; Muller et al., 2010; Stoppini et al., 1991). Ebenso wie in neuronalen PC12 Zellen konnte hier ein Schutz vor Caspase-abhängiger Apoptose durch sAPP α unter proteasomalem Stress nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde der Effekt von Epoxomicin in An- oder Abwesenheit von sAPP α auf Einzelzellebene untersucht. Die Behandlung mit Epoxomicin zeigte deutliche Zeichen der Degeneration von Neuronen, wie dendritisches „Blebbing“, dünner werdende Dendriten und der Verlust von Spines. Im Hinblick darauf gibt es Hinweise auf Caspase-abhängige Prozesse in Dendriten, die den frühen Verlust von Synapsen während der Progression der Alzheimer Krankheit begünstigen (Mattson et al., 1998a; Mattson et al., 1998b). Ein

langanhaltender neurotoxischer Stress könnte demnach in einer somatischen Caspase-Aktivierung resultieren und letztendlich neuronalen Zelltod verursachen. Der Verlust von Spines ist bei Morbus Alzheimer gut dokumentiert und es wird vermutet, dass er durch A β induzierte synaptotoxische Effekte induziert wird (Shankar et al., 2007; Walsh et al., 2002a; Walsh et al., 2002b). Dieser Verlust und der Verlust von Synapsen sind vielen neurodegenerativen Erkrankungen gemein und werden strikt mit funktionalen Defiziten der Krankheit assoziiert. Eine Vorbehandlung mit sAPP α konnte die zytotoxischen Epoxomicin-Effekte größtenteils aufheben. Darüber hinaus konnte sAPP α zur Erhaltung der dendritischen Integrität unter Epoxomicin-induzierten Stressbedingungen beitragen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sAPP α nicht nur in diesem experimentellen Ansatz synaptotoxischen Effekten, sondern auch ähnlichen durch A β -induzierten, entgegenwirken kann. Gleichmaßen könnte die Erhöhung des amyloiden APP-Prozessierungsweges oder der Verlust von sAPP α auf ähnliche Weise zu dem Verlust von Spines bzw. Synapsen führen, was schließlich in der Beeinträchtigung oder dem Verlust der kognitiven Fähigkeiten bei Alzheimer Patienten resultiert. Ein möglicher antagonistisch wirkender pharmakologischer Ansatzpunkt, könnte dem zu Folge die Erhöhung der nicht-amyloiden Prozessierung und die damit verbundene erhöhte Produktion des protektiven APP-Spaltproduktes sAPP α sein. Eine Möglichkeit soll im nächsten Abschnitt näher erläutert werden.

6.2 DHA ERHÖHT NEURONALES ZELLÜBERLEBEN DURCH STEIGERUNG DES NICHT-AMYLOIDOGENEN APP-PROZESSIERUNGSWEGES

In den bisher gezeigten Untersuchungen konnte die Antagonisierung des JNK-Signalweges und die Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges durch sAPP α belegt werden. Eine daraus resultierende Protektion vor einer Epoxomicin-induzierten Apoptose zeigten Untersuchungen der Effektorcaspase-Aktivität. Zusätzlich konnte für sAPP α die Aufrechterhaltung der dendritischen Integrität unter proteasomalem Stress dokumentiert werden.

Im folgenden Abschnitt soll die Möglichkeit der Erhöhung des nicht-amyloiden Prozessierungsweges über die Behandlung mit einer Omega-3 Fettsäure, der Docosahexaensäure (DHA), untersucht werden. Hierbei stellen die Veränderung der Membranzusammensetzung und die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Membranen einen gemeinsamen Faktor des Alterungsprozesses und der Alzheimer

Krankheit dar (Dyall et al., 2007; Grange-Midroit et al., 2002; Uauy and Dangour, 2006). So konnte eine fortschreitende altersbedingte Abnahme der Membranfluidität, die in direktem Zusammenhang mit der Aktivität und Funktionalität von membranassoziierten Proteinen wie z.B. APP steht, belegt werden (Eckert et al., 2001b). Darüber hinaus konnte eine Abnahme der APP-Maturierung und -Prozessierung in Abhängigkeit des Alterungsprozesses belegt werden (Kern et al., 2006). In diesem Zusammenhang spielen ungesättigte Fettsäuren als regulativer Bestandteil von neuronalen Zellmembranen eine wichtige Rolle. Der Einbau von ungesättigten Fettsäuren ist für die Modulation der Membranfluidität essentiell. Für die Behandlung mit DHA sollte in diesem Zusammenhang geprüft werden, ob eine Steigerung der Membranfluidität mit einer erhöhten nicht-amyloidogenen Prozessierung einhergeht und ob eine daraus resultierende Protektion vor Stress-induziertem Zelltod besteht.

6.2.1 DHA WIRD IN DIE ZELLMEMBRAN INKORPORIERT UND STEIGERT DIE MEMBRANFLUIDITÄT

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind essentiell für die Regulation der Membranfluidität, wobei DHA eine der häufigsten Fettsäuren in neuronalen Zellmembranen darstellt und damit ein wichtiger Modulator für deren Membranfluidität ist. Überdies wird angenommen, dass Änderungen in der Zusammensetzung und Architektur der Zellmembran Einfluss auf die Funktionalität besitzen. Dieser Annahme folgend, spielen mehrfach ungesättigte Fettsäuren eine wichtige Rolle im Alterungsprozess und der Neurodegeneration bei Morbus Alzheimer (Eckert et al., 2000; Eckert et al., 2010; Yang et al., 2010). Innerhalb des Alterungsprozesses nimmt der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in neuronalen Zellmembranen ab, was sich in einer verringerten Membranfluidität zeigt (Dyall et al., 2007; Uauy and Dangour, 2006). Der zusätzliche Einbau von Omega-3 Fettsäuren als Alkylkette in die Phospholipide von neuronale Zellmembranen könnte demnach dem Alterungsprozess entgegen wirken und sich folglich günstig auf kognitive Funktionen auswirken (Barcelo-Coblijn et al., 2003a; Barcelo-Coblijn et al., 2003b; Langelier et al., 2010; Oster and Pillot, 2010). Ein direkter fluidisierender Effekt durch DHA konnte in Retinoblastoma-Zellen (Treen et al., 1992) und in synaptosomalen Plasma-Membranen (Hashimoto et al., 2006b), die aus mit A β behandelten Ratten-Gehirnen isoliert wurden, gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass eine Verringerung der Membranfluidität, beispielsweise durch erhöhte Cholesterin-Einlagerungen in die Zellmembran, die Generierung von A β erleichtert wird (Burns and Duff, 2003, Simons et al., 1998, Refolo et al., 2000). So scheint die Prozessierung durch die α -Sekretase vermindert zu sein. Die Ursache könnte in der Schnittstelle der α -Sekretase zu

finden sein, da diese nicht nur von der APP-Primärsequenz bestimmt wird, sondern ebenfalls von der Sekundärstruktur (α -Helix) und dem Abstand zur Membran abhängig zu sein scheint (Sisodia, 1992; Turner et al., 2003). Die veränderte Lipidzusammensetzung der Membran durch erhöhte Cholesterineinlagerung inhibiert den Kontakt zwischen α -Sekretase und ihrem Substrat APP (Bodovitz and Klein, 1996). Diese Befunde zeigen deutlich die hohe Relevanz der Membranfluidität in Zusammenhang mit der Prozessierung von APP und ergeben dadurch einen pharmakologischen Ansatzpunkt.

In diesem Kontext konnte durch eine Behandlung mit liposomaler DHA eine erhöhte Membranfluidität, durch Messung der Anisotropie, in APP überexprimierenden HEK Zellen festgestellt werden. Die Behandlung mit der vollständig gesättigten Docosansäure, die ebenfalls in Liposomen verpackt wurde, resultierte in einer leicht verringerten Membranfluidität. Dies entsprach der Erwartung, da für gesättigte Fettsäuren ein diametraler Einfluss auf die Membranfluidität bekannt ist, was in einer rigideren Membran resultiert. Die Verpackung der Fettsäuren in Liposomen stellte sich somit als adäquate Formulierung zur Aufnahme der Fettsäuren in die Zellen dar.

6.2.2 DHA BEEINFLUSST DIE PROZESSIERUNG VON APP

Für DHA konnten verschiedene Funktionen in der Vermittlung von Membran-Protein Interaktion (Litman and Mitchell, 1996), Modulation von Genexpression (Kitajka et al., 2002) und der Neurogenese (Beltz et al., 2007; Kawakita et al., 2006; Robson et al., 2010; Sakamoto et al., 2007; Wurtman et al., 2009) nachgewiesen werden. Des Weiteren gibt es Hinweise aus Alzheimer-Mausmodellen, dass speziell DHA den Abfall kognitiver Fähigkeiten verringern kann. Ferner konnte synaptische Degeneration und die Generierung von A β Aggregaten vermindert werden (Calon et al., 2004; Green et al., 2007; Lim et al., 2005; Oksman et al., 2006; Su, 2010; Yurko-Mauro et al., 2010). Darüber hinaus konnten die altersbedingten Änderungen in der Membranfluidität mit Veränderungen des APP-Metabolismus in Beziehung gebracht werden (Clement et al., 2010; Kojro et al., 2001; Peters et al., 2009). Eine erhöhte Membranfluidität begünstigt demnach die nicht-amyloidogene Spaltung von APP. In Übereinstimmung damit konnten in Abhängigkeit von DHA erhöhte sAPP α -Level im Kulturüberstand von HEK-APP Zellen und verringerte Mengen an C99 nachgewiesen werden.

6.2.3 DHA SCHÜTZT VOR THAPSIGARGIN-INDUZIERTER APOPTOSE

In vorangegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Verfütterungsstudien mit DHA den Gehalt an bestimmten Fettsäuren im Gehirn von Meerschweinchen erhöhen konnte. Der Nachweis von erhöhten Mengen an DHA korrelierte mit einem Schutz vor nitrosativem Stress, der in dissoziierten Neuronenkulturen induziert wurde (Eckert et al., 2010). Verschiedene Studien belegen einen neuroprotektiven Effekt durch DHA. So konnte ein Schutz vor oxidativem Stress (Rotstein et al., 2003) und vor durch Glutamat-induzierten toxischen Ca^{2+} -Spiegeln (Wang et al., 2003) nachgewiesen werden.

Der in dieser Arbeit verwendet Stimulus Thapsigargin bewirkt ebenfalls eine Störung der Kalziumhomöostase. Als Inhibitor der sarko- und endplasmatischen Ca^{2+} -ATPasen resultiert die Applikation in der Störung der empfindlichen Kalziumhomöostase, was eng in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson gebracht werden konnte (LaFerla, 2002; Mattson, 2000; Paschen and Mengesdorf, 2005). Die toxische Ca^{2+} -Freisetzung bewirkt unter anderem die Aktivierung von Caspasen und leitet damit Apoptose ein. Für sAPP α konnten in diesem Kontext bereits neuroprotektive Eigenschaften nachgewiesen werden. So zeigten Studien von Goodman und Barger das sAPP α in der Lage ist A β - oder Glutamat-induzierten erhöhten Ca^{2+} -Spiegeln entgegenwirken kann (Barger and Mattson, 1995; Goodman and Mattson, 1994). In Übereinstimmung mit diesen Studien konnte eine Protektion vor Thapsigargin-induzierter Apoptose durch die Präinkubation der PC12 Zellen mit sAPP α -haltigem konditioniertem Medium nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte ein Schutz vor Apoptose durch DHA gezeigt werden. Im gleichen experimentellen Ansatz war es möglich eine Protektion vor mitochondrialer Dysfunktion und ATP-Depletion zu zeigen (Eckert et al., 2011). Die hierbei verwendeten Dosen und Behandlungszeiträume zeigten, dass eine Langzeitbehandlung mit einer geringen Konzentration (20 μM) vergleichbare Effekte wie eine Kurzzeitbehandlung mit hohen Konzentrationen (50 μM – 250 μM) hervorrufen kann. In den APP-überexprimierenden HEK Zellen konnte die beobachtete Protektion durch DHA nach Thapsigargin-Behandlung auf eine Modulation des Prozessierungsweges von APP zurückgeführt werden. Hierfür sprachen die grundlegenden Analysen der Kulturüberstände nach der DHA-Behandlung, die eine erhöhte Menge an sAPP α aufwiesen. Im Gegenzug dazu zeigte die Analyse der Gesamtzelllysate eine verringerte Menge des C-terminalen Fragmentes C99, einem Spaltprodukt, das über den amyloidogenen Prozessierungsweg entsteht. Darüber hinaus konnte diese These durch die Verwendung von Überständen von HEK-APP Zellen, die mit

DHA präinkubiert wurden, bestätigt werden. Deren Verwendung zeigte einen potenzierten protektiven Effekt gegenüber einer Behandlung mit HEK-APP Überständen, ohne dass diese mit DHA vorbehandelt wurden. Für neuronale PC12 Zellen konnte durch eine Kurzzeitbehandlung ein differentieller Effekt auf die Viabilität der Zellen in Abhängigkeit von DHA vermerkt werden. Außerdem initiierten die verwendeten hohen DHA-Konzentrationen (50 μM & 150 μM) einen potenten Schutz vor Thapsigargin-induzierter Apoptose.

Einen möglichen Mechanismus, der die Neuroprotektion von sAPP α durch DHA verstärkt, zeigten Lukiw und Kollegen. In dieser Studie konnte erstmals belegt werden, dass NPD1 (*Neuroprotectin D1*), ein Derivat der DHA, Apoptose-reduzierend wirken kann und außerdem die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung begünstigt (Lukiw et al., 2005). Die Behandlung der Zellkulturen mit DHA steigert demnach nicht nur die Membranfluidität und begünstigt dadurch die α -Sekretase Spaltung von APP, sondern könnte durch die Generierung von NPD1 aus DHA direkt auf die Prozessierung von APP Einfluss nehmen (Abbildung 6-2). Außerdem ist für sAPP α bekannt, dass es die Biosynthese von NPD1 aus DHA unterstützt (Lukiw et al., 2005). Zhao et al. konnten darüber hinaus belegen, dass NPD1 im Gegenzug die Sekretion von sAPP α durch Verringerung der BACE1-Aktivität und Steigerung der ADAM10-Aktivität, begünstigt. Als Vermittler dieser Prozesse wird der nukleäre Rezeptor PPAR γ vermutet. NPD1 könnte direkt oder indirekt über andere Mechanismen diesen Rezeptor aktivieren. Eine darüber vermittelte Repression des amyloidogenen Prozessierungswegs, durch Modulation der β -Sekretase BACE1, scheint plausibel (Zhao et al., 2011). Diese positive Rückkopplung zwischen sAPP α und DHA stellt einen möglichen Mechanismus dar, der den neuroprotektiven Effekt verstärkt (Abbildung 6-2). In diesem Zusammenhang könnte die verminderte altersabhängige Expression von APP und die dadurch entstehende verringerte sAPP α -Produktion durch den zusätzlichen Einbau von DHA in die Zellmembran ausgeglichen werden. Ein partieller Verlust der physiologischen APP/sAPP α Funktion könnte dem zu Folge möglicherweise durch DHA kompensiert werden.

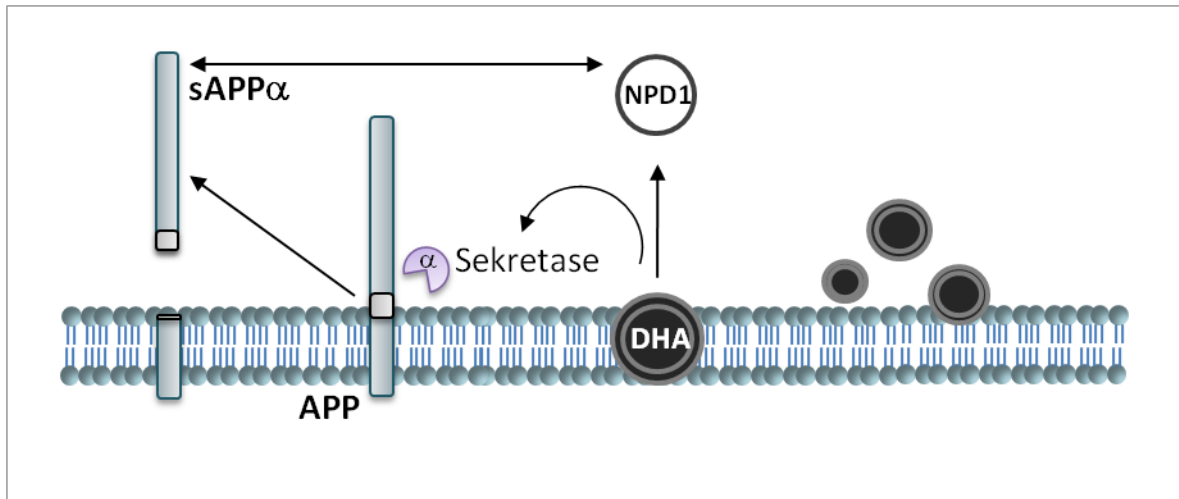


ABBILDUNG 6-2: Einfluss von DHA auf die Prozessierung von APP.

(Erklärung siehe Text)

Neben der Verpackung der Fettsäuren in Liposomen wurde überprüft, ob andere Formulierungen ebenfalls geeignet sind, den Transfer der Fettsäuren zu den Zellen zu ermöglichen. Eine einfache Methode stellt hierbei die Komplexierung von DHA an BSA dar. So sollte überprüft werden ob eine Reproduktion des Schutzes vor Thapsigargin- und Staurosporin-induzierter Apoptose durch Vorbehandlung mit dem DHA-BSA Komplex gegeben ist. Unter gleichen Stressbedingungen stellte sich ein ähnlich protektiver Effekt ein. Zusammengenommen kann festgestellt werden, dass die Komplexierung von DHA an BSA eine alternative Möglichkeit für den Transfer der Fettsäuren zu den Zellen *in vitro* bietet. Für *in vivo* Applikationen stellen die Verpackung in Liposomen bzw. perspektivisch in Nanopartikel wahrscheinlich eine geeignetere Möglichkeit dar. Da bekannten Vorteile von Liposomen darin bestehen, dass diese Verpackungsform den Inhalt vor Degradation schützt und eine Möglichkeit bietet die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Hossain et al., 2005, Venkataram et al., 1994).

7 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Entwicklung der Alzheimer Krankheit spielt das Amyloid-Precursor-Protein und seine proteolytische Spaltung eine zentrale Rolle. Die Prozessierung von APP resultiert im amyloidogenen Weg in der Bildung des neurotoxischen A β -Peptids und im nicht-amyloidogenen Weg in der Produktion von sAPP α , welches vermutet wird in seiner Funktion diametral zu A β zu stehen. Demgemäß könnte neben der pathologischen Akkumulation von A β im Gehirn ebenso der Verlust der physiologischen Funktion von sAPP α zur Neurodegeneration und den kognitiven Defiziten bei Morbus Alzheimer führen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die biologischen Eigenschaften des neuroprotektiven Spaltproduktes sAPP α unter verschiedenen Alzheimer-relevanten Stressbedingungen untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Störung des Ubiquitin-Proteasom-Systems, welche eng in Zusammenhang mit zytotoxischem neuronalen Stress bei Morbus Alzheimer gebracht wird, durch Applikation eines potenten Proteasom-Inhibitors initiiert. Für die Untersuchung der Eigenschaften von sAPP α unter den gewählten Bedingungen wurden zum einen konditionierte Überstände von APP-überexprimierenden HEK-Zellen oder aufgereinigtes rekombinantes sAPP α aus verschiedenen Expressionssystemen verwendet. Eine Präinkubation mit sAPP α bewirkte einen Schutz vor Zelltod in PC12 Zellen, wie morphologische Untersuchungen der Fragmentierung der Zellkerne, der Aufnahme von Propidiumiodid und Analysen der Effektor-Caspase-Aktivität aufzeigten. Dieser potente Schutz in der PC12-Zelllinie konnte nur für sAPP α und nicht für sAPP β , ein APP-Spaltprodukt das sich nur um 17 Aminosäuren unterscheidet, nachgewiesen werden.

Das im zweiten Teil der Arbeit verwendete Schädigungsmodell der Störung der Kalziumhomöostase konnte durch die Inhibition der sarko- und endoplasmatischen Ca²⁺-ATPasen oder durch Behandlung mit NMDA realisiert werden. Die Störung des empfindlichen Kalziumhaushaltes stellt ein gemeinsames Merkmal für die Alterserscheinung des Gehirns und der Pathophysiologie von Morbus Alzheimer dar. In der vorliegenden Arbeit gelang es Apoptose, die durch die Störung der Kalziumhomöostase ausgelöst wurde, durch sAPP α potent zu verringern. Dieser protektive Effekt von sAPP α für PC12 Zellen konnte für hippocampale Neurone validiert werden. Für beide Schädigungsmodelle konnte der anti-apoptotische Effekt von sAPP α mit der Inhibition des Stress-responsiven JNK/c-Jun Signalweges und der Stimulation des anti-apoptotischen PI3K/Akt Signalweges assoziiert werden. Ein möglicher pharmakologisch, präventiver Ansatzpunkt in der Alzheimer Krankheit stellt die Einflussnahme auf die proteolytische Spaltung von APP dar. So könnte sich eine

Stimulation der nicht-amyloidogenen Prozessierung, die in der Produktion des neuroprotektiven Bestandteils sAPP α resultiert, A β -induzierte neurotoxische Effekte ausgleichen. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Docosahexaensäure, einer Omega-3 Fettsäure, Einfluss auf die Membranfluidität von APP überexprimierenden HEK Zellen genommen werden. Die erhöhte Membranfluidität ließ sich mit einer gesteigerten Menge an sAPP α und somit einer erhöhten nicht-amyloidogenen Prozessierung korrelieren. Hieraus resultierend konnte eine Behandlung mit DHA eine Protektion vor Apoptose, die durch die Störung der Kalziumhomöostase induziert wurde, erzielen. Es konnte nachgewiesen werden, dass der protektive DHA-abhängige Effekt auf sAPP α zurückzuführen ist.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdul, H.M., R. Sultana, D.K. St Clair, W.R. Markesbery, and D.A. Butterfield. 2008. Oxidative damage in brain from human mutant APP/PS-1 double knock-in mice as a function of age. *Free Radic Biol Med.* 45:1420-1425.
- Anderson, A.J., C.J. Pike, and C.W. Cotman. 1995. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by beta-amyloid (A beta): association of c-Jun with A beta-induced apoptosis. *J Neurochem.* 65:1487-1498.
- Arendt, T. 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118:167-179.
- Arispe, N., E. Rojas, and H.B. Pollard. 1993. Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90:567-571.
- Back, S., P. Haas, J.A. Tschape, T. Gruebl, J. Kirsch, U. Muller, K. Beyreuther, and S. Kins. 2007. beta-amyloid precursor protein can be transported independent of any sorting signal to the axonal and dendritic compartment. *Journal of neuroscience research.* 85:2580-2590.
- Barcelo-Coblijn, G., E. Högges, K. Kitajka, L.G. Puskas, A. Zvara, L. Hackler, Jr., C. Nyakas, Z. Penke, and T. Farkas. 2003a. Modification by docosahexaenoic acid of age-induced alterations in gene expression and molecular composition of rat brain phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100:11321-11326.
- Barcelo-Coblijn, G., K. Kitajka, L.G. Puskas, E. Högges, A. Zvara, L. Hackler, Jr., and T. Farkas. 2003b. Gene expression and molecular composition of phospholipids in rat brain in relation to dietary n-6 to n-3 fatty acid ratio. *Biochimica et biophysica acta.* 1632:72-79.
- Barger, S.W., and M.P. Mattson. 1995. The secreted form of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein stimulates a membrane-associated guanylate cyclase. *Biochem J.* 311 (Pt 1):45-47.
- Barger, S.W., and M.P. Mattson. 1996. Induction of neuroprotective kappa B-dependent transcription by secreted forms of the Alzheimer's beta-amyloid precursor. *Brain research.* 40:116-126.
- Barthwal, M.K., P. Sathyanarayana, C.N. Kundu, B. Rana, A. Pradeep, C. Sharma, J.R. Woodgett, and A. Rana. 2003. Negative regulation of mixed lineage kinase 3 by protein kinase B/AKT leads to cell survival. *J Biol Chem.* 278:3897-3902.
- Behr, D., L. Hesse, C.L. Masters, and G. Multhaup. 1996. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem.* 271:1613-1620.
- Behl, C. 2000. Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 107:1325-1344.
- Bekris, L.M., C.E. Yu, T.D. Bird, and D.W. Tsuang. 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23:213-227.
- Bell, K.F., L. Zheng, F. Fahrenholz, and A.C. Cuello. 2008. ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging.* 29:554-565.
- Beltz, B.S., M.F. Tlustý, J.L. Benton, and D.C. Sandeman. 2007. Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. *Neuroscience letters.* 415:154-158.
- Bence, N.F., R.M. Sampat, and R.R. Kopito. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science.* 292:1552-1555.
- Bennett, B.D., S. Babu-Khan, R. Loeloff, J.C. Louis, E. Curran, M. Citron, and R. Vassar. 2000. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem.* 275:20647-20651.
- Bertrand, R., E. Solary, P. O'Connor, K.W. Kohn, and Y. Pommier. 1994. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res.* 211:314-321.
- Bezprozvanny, I., and M.P. Mattson. 2008. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 31:454-463.
- Blanc, E.M., J.N. Keller, S. Fernandez, and M.P. Mattson. 1998. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, impairs glutamate transport in cortical astrocytes. *Glia.* 22:149-160.
- Bodovitz, S., and W.L. Klein. 1996. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 271:4436-4440.
- Bogdanovic, N. 2000. Alzheimer's disease: plaques and tangles. *J Cell Mol Med.* 4:304-305.
- Bogoyevitch, M.A., I. Boehm, A. Oakley, A.J. Ketterman, and R.K. Barr. 2004. Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochimica et biophysica acta.* 1697:89-101.
- Bondy, C.A., and C.M. Cheng. 2004. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol.* 490:25-31.

- Bordji, K., J. Becerril-Ortega, O. Nicole, and A. Buisson. 2010. Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid-ss production. *J Neurosci.* 30:15927-15942.
- Bourne, J.N., and K.M. Harris. 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu Rev Neurosci.* 31:47-67.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82:239-259.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Braithwaite, S.P., R.S. Schmid, D.N. He, M.L. Sung, S. Cho, L. Resnick, M.M. Monaghan, W.D. Hirst, C. Essrich, P.H. Reinhart, and D.C. Lo. 2010. Inhibition of c-Jun kinase provides neuroprotection in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease.* 39:311-317.
- Bressler, S.L., M.D. Gray, B.L. Sopher, Q. Hu, M.G. Hearn, D.G. Pham, M.B. Dinulos, K. Fukuchi, S.S. Sisodia, M.A. Miller, C.M. Distech, and G.M. Martin. 1996. cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein. *Hum Mol Genet.* 5:1589-1598.
- Brustovetsky, T., B. Antonsson, R. Jemmerson, J.M. Dubinsky, and N. Brustovetsky. 2005. Activation of calcium-independent phospholipase A (iPLA) in brain mitochondria and release of apoptogenic factors by BAX and truncated BID. *J Neurochem.* 94:980-994.
- Burns, M. and K. Duff. 2003. Use of in vivo models to study the role of cholesterol in the etiology of Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 28:979-986
- Buxbaum, J.D., K.N. Liu, Y. Luo, J.L. Slack, K.L. Stocking, J.J. Peschon, R.S. Johnson, B.J. Castner, D.P. Cerretti, and R.A. Black. 1998a. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem.* 273:27765-27767.
- Buxbaum, J.D., G. Thinakaran, V. Koliatsos, J. O'Callahan, H.H. Slunt, D.L. Price, and S.S. Sisodia. 1998b. Alzheimer amyloid protein precursor in the rat hippocampus: transport and processing through the perforant path. *J Neurosci.* 18:9629-9637.
- Cabrejo, L., L. Guyant-Marechal, A. Laquerriere, M. Vercelletto, F. De la Fourniere, C. Thomas-Anterion, C. Verny, F. Letournel, F. Pasquier, A. Vital, F. Checler, T. Frebourg, D. Campion, and D. Hannequin. 2006. Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain.* 129:2966-2976.
- Cai, H., Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D.R. Borchelt, D.L. Price, and P.C. Wong. 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci.* 4:233-234.
- Callahan, L.M., W.A. Vaules, and P.D. Coleman. 1999. Quantitative decrease in synaptophysin message expression and increase in cathepsin D message expression in Alzheimer disease neurons containing neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58:275-287.
- Calon, F., G.P. Lim, F. Yang, T. Morihara, B. Teter, O. Ubeda, P. Rostaing, A. Triller, N. Salem, Jr., K.H. Ashe, S.A. Frautschy, and G.M. Cole. 2004. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron.* 43:633-645.
- Cam, J.A., C.V. Zerbinatti, J.M. Knisely, S. Hecimovic, Y. Li, and G. Bu. 2004. The low density lipoprotein receptor-related protein 1B retains beta-amyloid precursor protein at the cell surface and reduces amyloid-beta peptide production. *J Biol Chem.* 279:29639-29646.
- Camandola, S., and M.P. Mattson. 2010. Aberrant subcellular neuronal calcium regulation in aging and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta.*
- Cano, E., and L.C. Mahadevan. 1995. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci.* 20:117-122.
- Cao, X., and T.C. Sudhof. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science.* 293:115-120.
- Capell, A., D. Beher, S. Prokop, H. Steiner, C. Kaether, M.S. Shearman, and C. Haass. 2005. Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway. *J Biol Chem.* 280:6471-6478.
- Castegna, A., M. Aksenov, M. Aksenova, V. Thongboonkerd, J.B. Klein, W.M. Pierce, R. Booze, W.R. Markesbery, and D.A. Butterfield. 2002. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med.* 33:562-571.
- Cereghino, J.L., and J.M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24:45-66.

- Cheng, G., Z. Yu, D. Zhou, and M.P. Mattson. 2002. Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. *Experimental neurology*. 175:407-414.
- Cheng, S.B., P. Ferland, P. Webster, and E.L. Bearer. 2011. Herpes Simplex Virus Dances with Amyloid Precursor Protein while Exiting the Cell. *PLoS One*. 6:e17966.
- Chyung, J.H., and D.J. Selkoe. 2003. Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem*. 278:51035-51043.
- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A.Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, and D.J. Selkoe. 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*. 360:672-674.
- Citron, M., C. Vigo-Pelfrey, D.B. Teplow, C. Miller, D. Schenk, J. Johnston, B. Winblad, N. Venizelos, L. Lannfelt, and D.J. Selkoe. 1994. Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:11993-11997.
- Citron, M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St George Hyslop, and D.J. Selkoe. 1997. Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*. 3:67-72.
- Clement, A.B., G. Gimpl, and C. Behl. 2010. Oxidative stress resistance in hippocampal cells is associated with altered membrane fluidity and enhanced nonamyloidogenic cleavage of endogenous amyloid precursor protein. *Free Radic Biol Med*. 48:1236-1241.
- Clement, A.B., R. Hanstein, A. Schroder, H. Nagel, K. Endres, F. Fahrenholz, and C. Behl. 2008. Effects of neuron-specific ADAM10 modulation in an in vivo model of acute excitotoxic stress. *Neuroscience*. 152:459-468.
- Cole, G.M., and S.A. Frautschy. 2007. The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. *Exp Gerontol*. 42:10-21.
- Colombo, A., A. Bastone, C. Ploia, A. Scip, M. Salmona, G. Forloni, and T. Borsello. 2009. JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*. 33:518-525.
- Colombo, A., M. Repici, M. Pesaresi, S. Santambrogio, G. Forloni, and T. Borsello. 2007. The TAT-JNK inhibitor peptide interferes with beta amyloid protein stability. *Cell death and differentiation*. 14:1845-1848.
- Copanaki, E., S. Chang, A. Vlachos, J.A. Tschape, U.C. Muller, D. Kögel, and T. Deller. 2010. sAPPalpha antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Molecular and cellular neurosciences*. 44:386-393.
- Corder, E.H., A.M. Saunders, N.J. Risch, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, Jr., J.B. Rimmler, P.A. Locke, P.M. Conneally, K.E. Schmechel, and et al. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*. 7:180-184.
- Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, and M.A. Pericak-Vance. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 261:921-923.
- Corrigan, F., C.L. Pham, R. Vink, P.C. Blumbergs, C.L. Masters, C. van den Heuvel, and R. Cappai. 2011. The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res*.
- Cotman, C.W., and A.J. Anderson. 1995. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 10:19-45.
- Cruts, M., and C. Van Broeckhoven. 1998a. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Ann Med*. 30:560-565.
- Cruts, M., and C. Van Broeckhoven. 1998b. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat*. 11:183-190.
- Cummings, B.J., and C.W. Cotman. 1995. Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. *Lancet*. 346:1524-1528.
- D'Amelio, M., V. Cavallucci, S. Middei, C. Marchetti, S. Pacioni, A. Ferri, A. Diamantini, D. De Zio, P. Carrara, L. Battistini, S. Moreno, A. Bacci, M. Ammassari-Teule, H. Marie, and F. Cecconi. 2011. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 14:69-76.

- D'Andrea, M.R., R.G. Nagele, H.Y. Wang, P.A. Peterson, and D.H. Lee. 2001. Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology*. 38:120-134.
- Dahms, S.O., S. Hoefgen, D. Roeser, B. Schlott, K.H. Guhrs, and M.E. Than. 2010. Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:5381-5386.
- Dai, T., E. Rubie, C.C. Franklin, A. Kraft, D.A. Gillespie, J. Avruch, J.M. Kyriakis, and J.R. Woodgett. 1995. Stress-activated protein kinases bind directly to the delta domain of c-Jun in resting cells: implications for repression of c-Jun function. *Oncogene*. 10:849-855.
- Davis, R.J. 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci*. 19:470-473.
- Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103:239-252.
- Dawson, G.R., G.R. Seabrook, H. Zheng, D.W. Smith, S. Graham, G. O'Dowd, B.J. Bowery, S. Boyce, M.E. Trumbauer, H.Y. Chen, L.H. Van der Ploeg, and D.J. Sirinathsinghji. 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*. 90:1-13.
- De Felice, F.G., D. Wu, M.P. Lambert, S.J. Fernandez, P.T. Velasco, P.N. Lacor, E.H. Bigio, J. Jerecic, P.J. Acton, P.J. Shughrue, E. Chen-Dodson, G.G. Kinney, and W.L. Klein. 2008. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging*. 29:1334-1347.
- De Strooper, B., P. Saftig, K. Craessaerts, H. Vanderstichele, G. Guhde, W. Annaert, K. Von Figura, and F. Van Leuven. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 391:387-390.
- Del Turco, D., and T. Deller. 2007. Organotypic entorhino-hippocampal slice cultures--a tool to study the molecular and cellular regulation of axonal regeneration and collateral sprouting in vitro. *Methods Mol Biol*. 399:55-66.
- Dhanasekaran, D.N., and E.P. Reddy. 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 27:6245-6251.
- Dominguez, D., J. Tournoy, D. Hartmann, T. Huth, K. Cryns, S. Deforce, L. Serneels, I.E. Camacho, E. Marjaux, K. Craessaerts, A.J. Roebroek, M. Schwake, R. D'Hooge, P. Bach, U. Kalinke, D. Moechars, C. Alzheimer, K. Reiss, P. Saftig, and B. De Strooper. 2005. Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2-deficient mice. *J Biol Chem*. 280:30797-30806.
- Drubin, D., S. Kobayashi, and M. Kirschner. 1986. Association of tau protein with microtubules in living cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 466:257-268.
- Drubin, D.G., and M.W. Kirschner. 1986. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol*. 103:2739-2746.
- Dulin, F., F. Leveille, J.B. Ortega, J.P. Mornon, A. Buisson, I. Callebaut, and N. Colloc'h. 2008. P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett*. 582:1865-1870.
- Dyall, S.C., G.J. Michael, R. Whelpton, A.G. Scott, and A.T. Michael-Titus. 2007. Dietary enrichment with omega-3 polyunsaturated fatty acids reverses age-related decreases in the GluR2 and NR2B glutamate receptor subunits in rat forebrain. *Neurobiol Aging*. 28:424-439.
- Eckert, A., B. Steiner, C. Marques, S. Leutz, H. Romig, C. Haass, and W.E. Muller. 2001a. Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation. *Journal of neuroscience research*. 64:183-192.
- Eckert, G.P., N.J. Cairns, A. Maras, W.F. Gattaz, and W.E. Muller. 2000. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 11:181-186.
- Eckert, G.P., S. Chang, J. Eckmann, E. Copanaki, S. Hagl, U. Hener, W.E. Muller, and D. Kögel. 2011. Liposome-incorporated DHA increases neuronal survival by enhancing non-amyloidogenic APP processing. *Biochimica et biophysica acta*. 1808:236-243.
- Eckert, G.P., C. Franke, M. Noldner, O. Rau, M. Wurglics, M. Schubert-Zsilavecz, and W.E. Muller. 2010. Plant derived omega-3-fatty acids protect mitochondrial function in the brain. *Pharmacol Res*. 61:234-241.
- Eckert, G.P., W.G. Wood, and W.E. Muller. 2001b. Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes. *J Neural Transm*. 108:1051-1064.
- Ehehalt, R., P. Keller, C. Haass, C. Thiele, and K. Simons. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*. 160:113-123.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35:495-516.

- Endres, K., R. Postina, A. Schroeder, U. Mueller, and F. Fahrenholz. 2005. Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases. *FEBS J.* 272:5808-5820.
- Engvall, E., and P. Perlmann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8:871-874.
- Ernfors, P., and C.R. Bramham. 2003. The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP. *Trends Neurosci.* 26:171-173.
- Esch, F.S., P.S. Keim, E.C. Beattie, R.W. Blacher, A.R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, and P.J. Ward. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science.* 248:1122-1124.
- Estus, S., W.J. Zaks, R.S. Freeman, M. Gruda, R. Bravo, and E.M. Johnson, Jr. 1994. Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J Cell Biol.* 127:1717-1727.
- Fahrenholz, F. 2007. Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr Alzheimer Res.* 4:412-417.
- Farzan, M., C.E. Schnitzler, N. Vasilieva, D. Leung, and H. Choe. 2000. BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 97:9712-9717.
- Fedorova, I., N. Hussein, C. Di Martino, T. Moriguchi, J. Hoshiba, S. Majchrzak, and N. Salem, Jr. 2007. An n-3 fatty acid deficient diet affects mouse spatial learning in the Barnes circular maze. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77:269-277.
- Fiore, F., N. Zambrano, G. Minopoli, V. Donini, A. Duilio, and T. Russo. 1995. The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 270:30853-30856.
- Forero, D.A., G. Casadesus, G. Perry, and H. Arboleda. 2006. Synaptic dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease: emerging mechanisms. *J Cell Mol Med.* 10:796-805.
- Frotscher, M., S. Zafirov, and B. Heimrich. 1995. Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Progress in neurobiology.* 45:vii-xxviii.
- Fuchs, S.Y., V. Adler, M.R. Pincus, and Z. Ronai. 1998. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95:10541-10546.
- Fukumoto, H., B.S. Cheung, B.T. Hyman, and M.C. Irizarry. 2002. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 59:1381-1389.
- Furukawa, K., S.W. Barger, E.M. Blalock, and M.P. Mattson. 1996a. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature.* 379:74-78.
- Furukawa, K., and M.P. Mattson. 1998. Secreted amyloid precursor protein alpha selectively suppresses N-methyl-D-aspartate currents in hippocampal neurons: involvement of cyclic GMP. *Neuroscience.* 83:429-438.
- Furukawa, K., B.L. Sopher, R.E. Rydel, J.G. Begley, D.G. Pham, G.M. Martin, M. Fox, and M.P. Mattson. 1996b. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem.* 67:1882-1896.
- Gahwiler, B.H., M. Capogna, D. Debanne, R.A. McKinney, and S.M. Thompson. 1997. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 20:471-477.
- Gao, S., H.C. Hendrie, K.S. Hall, and S. Hui. 1998. The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry.* 55:809-815.
- Gao, Y., and S.W. Pimplikar. 2001. The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98:14979-14984.
- Garcia, M.L., and D.W. Cleveland. 2001. Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr Opin Cell Biol.* 13:41-48.
- Ghosal, K., D.L. Vogt, M. Liang, Y. Shen, B.T. Lamb, and S.W. Pimplikar. 2009. Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106:18367-18372.

- Glabe, C. 2001. Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci.* 17:137-145.
- Gleichmann, M., Y. Zhang, W.H. Wood, 3rd, K.G. Becker, M.R. Mughal, M.J. Pazin, H. van Praag, T. Kobil, A.B. Zonderman, J.C. Troncoso, W.R. Markesbery, and M.P. Mattson. 2010. Molecular changes in brain aging and Alzheimer's disease are mirrored in experimentally silenced cortical neuron networks. *Neurobiol Aging.*
- Glenner, G.G., and C.W. Wong. 1984a. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and biophysical research communications.* 122:1131-1135.
- Glenner, G.G., and C.W. Wong. 1984b. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications.* 120:885-890.
- Glomset, J.A. 2006. Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes. *Sci STKE.* 2006:pe6.
- Goate, A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James, and et al. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 349:704-706.
- Goedert, M., and M.G. Spillantini. 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science.* 314:777-781.
- Goodman, Y., and M.P. Mattson. 1994. Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Experimental neurology.* 128:1-12.
- Gorman, A.M. 2008. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med.* 12:2263-2280.
- Gotz, J., F. Chen, J. van Dorpe, and R.M. Nitsch. 2001. Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science.* 293:1491-1495.
- Gouras, G.K., J. Tsai, J. Naslund, B. Vincent, M. Edgar, F. Checler, J.P. Greenfield, V. Haroutunian, J.D. Buxbaum, H. Xu, P. Greengard, and N.R. Relkin. 2000. Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am J Pathol.* 156:15-20.
- Gralle, M., M.G. Botelho, and F.S. Wouters. 2009. Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *J Biol Chem.* 284:15016-15025.
- Grange-Midroit, M., J.A. Garcia-Sevilla, M. Ferrer-Alcon, R. La Harpe, C. Walzer, and J. Guimon. 2002. G protein-coupled receptor kinases, beta-arrestin-2 and associated regulatory proteins in the human brain: postmortem changes, effect of age and subcellular distribution. *Brain research.* 101:39-51.
- Green, K.N., H. Martinez-Coria, H. Khashwji, E.B. Hall, K.A. Yurko-Mauro, L. Ellis, and F.M. LaFerla. 2007. Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J Neurosci.* 27:4385-4395.
- Greene, L.A., and A.S. Tischler. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 73:2424-2428.
- Grossmann, J. 2002. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis.* 7:247-260.
- Gupta, S., D. Campbell, B. Derijard, and R.J. Davis. 1995. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science.* 267:389-393.
- Haass, C. 2004. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *The EMBO journal.* 23:483-488.
- Haass, C., E.H. Koo, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1994. Polarized secretion of beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91:1564-1568.
- Haass, C., E.H. Koo, A. Mellon, A.Y. Hung and D.J. Selkoe. 1992. Targeting of cell surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357:500-503
- Haass, C., M.G. Schlossmacher, A.Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B.L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E.H. Koo, D. Schenk, D.B. Teplow, and et al. 1992. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 359:322-325.
- Hamilton, J.A. 1998. Fatty acid transport: difficult or easy? *J Lipid Res.* 39:467-481.
- Hardy, J., and D.J. Selkoe. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297:353-356.
- Hardy, J.A., and G.A. Higgins. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256:184-185.

- Harold, D., R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M.L. Hamshere, J.S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A.R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M.K. Lupton, C. Brayne, D.C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K.S. Brown, P.A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A.D. Smith, S. Love, P.G. Kehoe, J. Hardy, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schurmann, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, M. Hull, D. Rujescu, A.M. Goate, J.S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J.C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P.P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N.J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C.E. Shaw, M. Tsolaki, A.B. Singleton, R. Guerreiro, T.W. Muhleisen, M.M. Nothen, S. Moebus, K.H. Jockel, N. Klopp, H.E. Wichmann, M.M. Carrasquillo, V.S. Pankratz, S.G. Younkin, P.A. Holmans, M. O'Donovan, M.J. Owen, and J. Williams. 2009. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41:1088-1093.
- Hartley, D.M., D.M. Walsh, C.P. Ye, T. Diehl, S. Vasquez, P.M. Vassilev, D.B. Teplow, and D.J. Selkoe. 1999. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci.* 19:8876-8884.
- Hartmann, T., S.C. Bieger, B. Bruhl, P.J. Tienari, N. Ida, D. Allsop, G.W. Roberts, C.L. Masters, C.G. Dotti, K. Unsicker, and K. Beyreuther. 1997. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med.* 3:1016-1020.
- Hashimoto, M., S. Hossain, and O. Shido. 2006a. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid withstands dietary cholesterol-induced decreases in platelet membrane fluidity. *Mol Cell Biochem.* 293:1-8.
- Hashimoto, M., S. Hossain, T. Shimada, and O. Shido. 2006b. Docosahexaenoic acid-induced protective effect against impaired learning in amyloid beta-infused rats is associated with increased synaptosomal membrane fluidity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 33:934-939.
- Hashimoto, Y., O. Tsuji, T. Niihara, Y. Yamagishi, M. Ishizaka, M. Kawasumi, T. Chiba, K. Kanekura, M. Yamada, E. Tsukamoto, and et al. 2003. Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. *J Neurochem.* 84:864-877.
- Heber, S., J. Herms, V. Gajic, J. Hainfellner, A. Aguzzi, T. Rulicke, H. von Kretschmar, C. von Koch, S. Sisodia, P. Tremml, H.P. Lipp, D.P. Wolfer, and U. Muller. 2000. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci.* 20:7951-7963.
- Hendriks, L., C.M. van Duijn, P. Cras, M. Cruts, W. Van Hul, F. van Harskamp, A. Warren, M.G. McInnis, S.E. Antonarakis, J.J. Martin, and et al. 1992. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet.* 1:218-221.
- Herard, A.S., L. Besret, A. Dubois, J. Dauguet, T. Delzescaux, P. Hantraye, G. Bonvento, and K.L. Moya. 2006. siRNA targeted against amyloid precursor protein impairs synaptic activity in vivo. *Neurobiol Aging.* 27:1740-1750.
- Herdegen, T., P. Skene, and M. Bahr. 1997. The c-Jun transcription factor--bipotent mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci.* 20:227-231.
- Herms, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretschmar, S. Sisodia, and U. Muller. 2004. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *The EMBO journal.* 23:4106-4115.
- Higgins, L.S., G.M. Murphy, Jr., L.S. Forno, R. Catalano, and B. Cordell. 1996. P3 beta-amyloid peptide has a unique and potentially pathogenic immunohistochemical profile in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol.* 149:585-596.
- Ho, A., and T.C. Sudhof. 2004. Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor protein cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101:2548-2553.
- Holsinger, R.M., C.A. McLean, S.J. Collins, C.L. Masters, and G. Evin. 2004. Increased beta-Secretase activity in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease subjects. *Annals of neurology.* 55:898-899.
- Holzberg, D., C.G. Knight, O. Dittrich-Breiholz, H. Schneider, A. Dorrie, E. Hoffmann, K. Resch and M. Kracht. 2003. Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide containing the c-JUN delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of IL-1-induced inflammatory genes. *J.Biol. Chem.* 278:40213-40223

- Hooper, C., R. Killick, and S. Lovestone. 2008. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 104:1433-1439.
- Hossain, Z., H. Kurhiara, M. Hosokawa, K. Takahashi. 2006. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid-enriched phosphatidylcholine liposomes enhance the permeability, transportation and uptake of phospholipids in Caco-2 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 285:155-163.
- Hossain, S., M. Hashimoto, M. Katakura, K. Miwa, T. Shimada, and O. Shido. 2009. Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro A β 1-42 fibrillation and A β 1-42-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *J Neurochem.* 111:568-579.
- Huber, G., Y. Bailly, J.R. Martin, J. Mariani, and B. Brugg. 1997. Synaptic beta-amyloid precursor proteins increase with learning capacity in rats. *Neuroscience.* 80:313-320.
- Igbavboa, U., N.A. Avdulov, F. Schroeder, and W.G. Wood. 1996. Increasing age alters transbilayer fluidity and cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes of mice. *J Neurochem.* 66:1717-1725.
- Ii, K., H. Ito, K. Tanaka, and A. Hirano. 1997. Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:125-131.
- Ishida, A., K. Furukawa, J.N. Keller, and M.P. Mattson. 1997. Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport.* 8:2133-2137.
- Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. Nukina, and Y. Ihara. 1994. Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron.* 13:45-53.
- Jaeger, P.A., F. Pickford, C.H. Sun, K.M. Lucin, E. Masliah, and T. Wyss-Coray. 2010. Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One.* 5:e11102.
- Jaeger, P.A., and T. Wyss-Coray. 2010. Beclin 1 complex in autophagy and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 67:1181-1184.
- Jellinger, K.A., and C. Stadelmann. 2001. Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 3:31-40.
- Jiang, L.H., Y. Shi, L.S. Wang, and Z.R. Yang. 2009. The influence of orally administered docosahexaenoic acid on cognitive ability in aged mice. *J Nutr Biochem.* 20:735-741.
- Jimenez, S., M. Torres, M. Vizuete, R. Sanchez-Varo, E. Sanchez-Mejias, L. Trujillo-Estrada, I. Carmona-Cuenca, C. Caballero, D. Ruano, A. Gutierrez, and J. Vitorica. 2011. Age-dependent accumulation of soluble A β oligomers reverses the neuroprotective effect of sAPP α by modulating PI3K/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mice model. *J Biol Chem.*
- Johnson, G.L., and K. Nakamura. 2007. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochimica et biophysica acta.* 1773:1341-1348.
- Jorm, A.F., and D. Jolley. 1998. The incidence of dementia: a meta-analysis. *Neurology.* 51:728-733.
- Kaden, D., L.M. Munter, M. Joshi, C. Treiber, C. Weise, T. Bethge, P. Voigt, M. Schaefer, M. Beyermann, B. Reif, and G. Multhaup. 2008. Homophilic interactions of the amyloid precursor protein (APP) ectodomain are regulated by the loop region and affect beta-secretase cleavage of APP. *J Biol Chem.* 283:7271-7279.
- Kaden, D., P. Voigt, L.M. Munter, K.D. Bobowski, M. Schaefer, and G. Multhaup. 2009. Subcellular localization and dimerization of APLP1 are strikingly different from APP and APLP2. *Journal of cell science.* 122:368-377.
- Kamal, A., G.B. Stokin, Z. Yang, C.H. Xia, and L.S. Goldstein. 2000. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron.* 28:449-459.
- Kang, J., H.G. Lemaire, A. Unterbeck, J.M. Salbaum, C.L. Masters, K.H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, and B. Muller-Hill. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A β protein resembles a cell-surface receptor. *Nature.* 325:733-736.
- Kang, J., and B. Muller-Hill. 1990. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A β precursor RNA in rat tissues: PreA β (695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochemical and biophysical research communications.* 166:1192-1200.
- Kawakita, E., M. Hashimoto, and O. Shido. 2006. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience.* 139:991-997.
- Keller, J.N., K.B. Hanni, and W.R. Markesbery. 2000. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 75:436-439.
- Keller, J.N., Z. Pang, J.W. Geddes, J.G. Begley, A. Germeyer, G. Waeg, and M.P. Mattson. 1997. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress

- and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem.* 69:273-284.
- Kern, A., B. Roempp, K. Prager, J. Walter, and C. Behl. 2006. Down-regulation of endogenous amyloid precursor protein processing due to cellular aging. *J Biol Chem.* 281:2405-2413.
- Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-257.
- Khachaturian, Z.S. 1989. Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 568:1-4.
- Kibbey, M.C., M. Jucker, B.S. Weeks, R.L. Neve, W.E. Van Nostrand, and H.K. Kleinman. 1993. beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90:10150-10153.
- Kimberly, W.T., J.B. Zheng, S.Y. Guenette, and D.J. Selkoe. 2001. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem.* 276:40288-40292.
- Kirsch, C., G.P. Eckert, A.R. Koudinov, and W.E. Muller. 2003a. Brain cholesterol, statins and Alzheimer's Disease. *Pharmacopsychiatry.* 36 Suppl 2:S113-119.
- Kirsch, C., G.P. Eckert, and W.E. Mueller. 2003b. Statin effects on cholesterol micro-domains in brain plasma membranes. *Biochem Pharmacol.* 65:843-856.
- Kitajka, K., L.G. Puskas, A. Zvara, L. Hackler, Jr., G. Barcelo-Coblijn, Y.K. Yeo, and T. Farkas. 2002. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99:2619-2624.
- Kögel, D., R. Schomburg, E. Copanaki, and J.H. Prehn. 2005. Regulation of gene expression by the amyloid precursor protein: inhibition of the JNK/c-Jun pathway. *Cell death and differentiation.* 12:1-9.
- Kögel, D., R. Schomburg, T. Schürmann, C. Reimertz, H.G. König, M. Poppe, A. Eckert, W.E. Müller, and J.H. Prehn. 2003. The amyloid precursor protein protects PC12 cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Neurochem.* 87:248-256.
- Kojro, E., G. Gimpl, S. Lammich, W. Marz, and F. Fahrenholz. 2001. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98:5815-5820.
- Koo, E.H., S.S. Sisodia, D.R. Archer, L.J. Martin, A. Weidemann, K. Beyreuther, P. Fischer, C.L. Masters, and D.L. Price. 1990a. Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 87:1561-1565.
- Koo, E.H., S.S. Sisodia, L.C. Cork, A. Unterbeck, R.M. Bayney, and D.L. Price. 1990b. Differential expression of amyloid precursor protein mRNAs in cases of Alzheimer's disease and in aged nonhuman primates. *Neuron.* 4:97-104.
- Krohn, A.J., E. Preis, and J.H. Prehn. 1998. Staurosporine-induced apoptosis of cultured rat hippocampal neurons involves caspase-1-like proteases as upstream initiators and increased production of superoxide as a main downstream effector. *J Neurosci.* 18:8186-8197.
- LaFerla, F.M. 2002. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Nature reviews.* 3:862-872.
- LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature reviews.* 8:499-509.
- Laird, F.M., H. Cai, A.V. Savonenko, M.H. Farah, K. He, T. Melnikova, H. Wen, H.C. Chiang, G. Xu, V.E. Koliatsos, D.R. Borchelt, D.L. Price, H.K. Lee, and P.C. Wong. 2005. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci.* 25:11693-11709.
- Lambert, J.C., and P. Amouyel. 2011. Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev.*
- Lambert, J.C., S. Heath, G. Even, D. Campion, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, D. Zelenika, M.J. Bullido, B. Tavernier, L. Letenneur, K. Bettens, C. Berr, F. Pasquier, N. Fievet, P. Barberger-Gateau, S. Engelborghs, P. De Deyn, I. Mateo, A. Franck, S. Helisalmi, E. Porcellini, O. Hanon, M.M. de Pancorbo, C. Lendon, C. Dufouil, C. Jaillard, T. Leveillard, V. Alvarez, P. Bosco, M. Mancuso, F. Panza, B. Nacmias, P. Bossu, P. Piccardi, G. Annoni, D. Seripa, D. Galimberti, D. Hannequin, F. Licastro, H. Soininen, K. Ritchie, H. Blanche, J.F. Dartigues, C. Tzourio, I. Gut, C. Van Broeckhoven, A. Alperovitch, M. Lathrop, and P. Amouyel. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41:1094-1099.

- Langelier, B., A. Linard, C. Bordat, M. Laviaille, and C. Heberden. 2010. Long chain-polyunsaturated fatty acids modulate membrane phospholipid composition and protein localization in lipid rafts of neural stem cell cultures. *J Cell Biochem.* 110:1356-1364.
- Lanz, T.A., D.B. Carter, and K.M. Merchant. 2003. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiology of disease.* 13:246-253.
- Lassmann, H., C. Bancher, H. Breitschopf, J. Wegiel, M. Bobinski, K. Jellinger, and H.M. Wisniewski. 1995. Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathol.* 89:35-41.
- Lazarov, O., M. Lee, D.A. Peterson, and S.S. Sisodia. 2002. Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J Neurosci.* 22:9785-9793.
- Lee, K.J., C.E. Moussa, Y. Lee, Y. Sung, B.W. Howell, R.S. Turner, D.T. Pak, and H.S. Hoe. 2010. Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience.* 169:344-356.
- Leissring, M.A., M.P. Murphy, T.R. Mead, Y. Akbari, M.C. Sugarman, M. Jannatipour, B. Anliker, U. Muller, P. Saftig, B. De Strooper, M.S. Wolfe, T.E. Golde, and F.M. LaFerla. 2002. A physiologic signaling role for the gamma -secretase-derived intracellular fragment of APP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99:4697-4702.
- Lemere, C.A., J.K. Blusztajn, H. Yamaguchi, T. Wisniewski, T.C. Saido, and D.J. Selkoe. 1996. Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiology of disease.* 3:16-32.
- Levy, E., M.D. Carman, I.J. Fernandez-Madrid, M.D. Power, I. Lieberburg, S.G. van Duinen, G.T. Bots, W. Luyendijk, and B. Frangione. 1990. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science.* 248:1124-1126.
- Liang, B., B.Y. Duan, X.P. Zhou, J.X. Gong, and Z.G. Luo. 2010. Calpain activation promotes BACE1 expression, amyloid precursor protein processing, and amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 285:27737-27744.
- Lichtenthaler, S.F. 2011. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem.* 116:10-21.
- Lim, G.P., F. Calon, T. Morihara, F. Yang, B. Teter, O. Ubeda, N. Salem, Jr., S.A. Frautschy, and G.M. Cole. 2005. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci.* 25:3032-3040.
- Lindsten, K., F.M. de Vrij, L.G. Verhoef, D.F. Fischer, F.W. van Leeuwen, E.M. Hol, M.G. Masucci, and N.P. Dantuma. 2002. Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J Cell Biol.* 157:417-427.
- Litman, B.J., and D.C. Mitchell. 1996. A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids.* 31 Suppl:S193-197.
- Loffler, J., and G. Huber. 1992. Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development. *J Neurochem.* 59:1316-1324.
- Loo, D.T., A. Copani, C.J. Pike, E.R. Whittemore, A.J. Walencewicz, and C.W. Cotman. 1993. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90:7951-7955.
- Lorenzo, A., M. Yuan, Z. Zhang, P.A. Paganetti, C. Sturchler-Pierrat, M. Staufenbiel, J. Mautino, F.S. Vigo, B. Sommer, and B.A. Yankner. 2000. Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* 3:460-464.
- Lourenco, F.C., V. Galvan, J. Fombonne, V. Corset, F. Llambi, U. Muller, D.E. Bredesen, and P. Mehlen. 2009. Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid-beta production. *Cell death and differentiation.* 16:655-663.
- Lovell, M.A., C. Xie, and W.R. Markesbery. 2001. Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures. *Neurobiol Aging.* 22:187-194.
- Lu, D.C., G.M. Shaked, E. Masliah, D.E. Bredesen, and E.H. Koo. 2003. Amyloid beta protein toxicity mediated by the formation of amyloid-beta protein precursor complexes. *Annals of neurology.* 54:781-789.
- Lue, L.F., Y.M. Kuo, A.E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J.H. Kurth, R.E. Rydel, and J. Rogers. 1999. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 155:853-862.

- Lukiw, W.J., J.G. Cui, V.L. Marcheselli, M. Bodker, A. Botkjaer, K. Gotlinger, C.N. Serhan, and N.G. Bazan. 2005. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 115:2774-2783.
- Luo, J.J., M.S. Wallace, D.B. Hawver, J.W. Kusiak, and W.C. Wallace. 2001a. Characterization of the neurotrophic interaction between nerve growth factor and secreted alpha-amyloid precursor protein. *Journal of neuroscience research.* 63:410-420.
- Luo, Y., B. Bolon, S. Kahn, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J.C. Louis, Q. Yan, W.G. Richards, M. Citron, and R. Vassar. 2001b. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci.* 4:231-232.
- Magara, F., U. Muller, Z.W. Li, H.P. Lipp, C. Weissmann, M. Stagliar, and D.P. Wolfer. 1999. Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 96:4656-4661.
- Mandelkow, E. 1999. Alzheimer's disease. The tangled tale of tau. *Nature.* 402:588-589.
- Mark, R.J., K. Hensley, D.A. Butterfield, and M.P. Mattson. 1995. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. *J Neurosci.* 15:6239-6249.
- Mark, R.J., J.N. Keller, I. Kruman, and M.P. Mattson. 1997a. Basic FGF attenuates amyloid beta-peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na⁺/K⁺-ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain research.* 756:205-214.
- Mark, R.J., Z. Pang, J.W. Geddes, K. Uchida, and M.P. Mattson. 1997b. Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation. *J Neurosci.* 17:1046-1054.
- Marszalek, J.R., and H.F. Lodish. 2005. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:633-657.
- Mattson, M.P. 1994. Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 747:50-76.
- Mattson, M.P. 1997. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev.* 77:1081-1132.
- Mattson, M.P. 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:120-129.
- Mattson, M.P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430:631-639.
- Mattson, M.P. 2010. ER calcium and Alzheimer's disease: in a state of flux. *Sci Signal.* 3:pe10.
- Mattson, M.P., S.W. Barger, B. Cheng, I. Lieberburg, V.L. Smith-Swintosky, and R.E. Rydel. 1993a. beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 16:409-414.
- Mattson, M.P., and S.L. Chan. 2003. Calcium orchestrates apoptosis. *Nature cell biology.* 5:1041-1043.
- Mattson, M.P., and B. Cheng. 1993. Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Stroke.* 24:1136-140; discussion 1144-135.
- Mattson, M.P., B. Cheng, A.R. Culwell, F.S. Esch, I. Lieberburg, and R.E. Rydel. 1993b. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron.* 10:243-254.
- Mattson, M.P., and K. Furukawa. 1998. Signaling events regulating the neurodevelopmental triad. Glutamate and secreted forms of beta-amyloid precursor protein as examples. *Perspect Dev Neurobiol.* 5:337-352.
- Mattson, M.P., Z.H. Guo, and J.D. Geiger. 1999. Secreted form of amyloid precursor protein enhances basal glucose and glutamate transport and protects against oxidative impairment of glucose and glutamate transport in synaptosomes by a cyclic GMP-mediated mechanism. *J Neurochem.* 73:532-537.
- Mattson, M.P., J.N. Keller, and J.G. Begley. 1998a. Evidence for synaptic apoptosis. *Experimental neurology.* 153:35-48.
- Mattson, M.P., J. Partin, and J.G. Begley. 1998b. Amyloid beta-peptide induces apoptosis-related events in synapses and dendrites. *Brain research.* 807:167-176.
- Mayol, V., M.J. Duran, A. Gerbi, F. Dignat-George, S. Levy, J. Sampol, and J.M. Maixent. 1999. Cholesterol and omega-3 fatty acids inhibit Na, K-ATPase activity in human endothelial cells. *Atherosclerosis.* 142:327-333.

- McLean, C.A., R.A. Cherny, F.W. Fraser, S.J. Fuller, M.J. Smith, K. Beyreuther, A.I. Bush, and C.L. Masters. 1999. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*. 46:860-866.
- Meng, L., R. Mohan, B.H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, and C.M. Crews. 1999. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:10403-10408.
- Meziane, H., J.C. Dodart, C. Mathis, S. Little, J. Clemens, S.M. Paul, and A. Ungerer. 1998. Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:12683-12688.
- Milward, E.A., R. Papadopoulos, S.J. Fuller, R.D. Moir, D. Small, K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1992. The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth. *Neuron*. 9:129-137.
- Mishto, M., E. Bellavista, A. Santoro, A. Stolzing, C. Ligorio, B. Nacmias, L. Spazzafumo, M. Chiappelli, F. Licastro, S. Sorbi, A. Pession, T. Ohm, T. Grune, and C. Franceschi. 2006. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging*. 27:54-66.
- Mori, H., J. Kondo, and Y. Ihara. 1987. Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*. 235:1641-1644.
- Moriguchi, T., F. Toyoshima, N. Masuyama, H. Hanafusa, Y. Gotoh, and E. Nishida. 1997. A novel SAPK/JNK kinase, MKK7, stimulated by TNFalpha and cellular stresses. *The EMBO journal*. 16:7045-7053.
- Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, K. Titani, and Y. Ihara. 1993. Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron*. 10:1151-1160.
- Morishima, Y., Y. Gotoh, J. Zieg, T. Barrett, H. Takano, R. Flavell, R.J. Davis, Y. Shirasaki, and M.E. Greenberg. 2001. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci*. 21:7551-7560.
- Morrison, J.H., and P.R. Hof. 1997. Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. 278:412-419.
- Mulder, S.D., W.M. van der Flier, J.H. Verheijen, C. Mulder, P. Scheltens, M.A. Blankenstein, C.E. Hack, and R. Veerhuis. 2010. BACE1 activity in cerebrospinal fluid and its relation to markers of AD pathology. *J Alzheimers Dis*. 20:253-260.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, and L. Lannfelt. 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. 1:345-347.
- Muller, C.M., A. Vlachos, and T. Deller. 2010. Calcium homeostasis of acutely denervated and lesioned dentate gyrus in organotypic entorhino-hippocampal co-cultures. *Cell Calcium*. 47:242-252.
- Muller, T., C.G. Concannon, M.W. Ward, C.M. Walsh, A.L. Tirniceriu, F. Tribl, D. Kögel, J.H. Prehn, and R. Egensperger. 2007. Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *Molecular biology of the cell*. 18:201-210.
- Muller, T., H.E. Meyer, R. Egensperger, and K. Marcus. 2008. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*. 85:393-406.
- Muller, U., N. Cristina, Z.W. Li, D.P. Wolfer, H.P. Lipp, T. Rulicke, S. Brandner, A. Aguzzi, and C. Weissmann. 1994. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Cell*. 79:755-765.
- Munter, L.M., P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K.E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, and G. Multhaup. 2007. GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42. *The EMBO journal*. 26:1702-1712.
- Muskiet, F.A., S.A. van Goor, R.S. Kuipers, F.V. Velzing-Aarts, E.N. Smit, H. Bouwstra, D.A. Dijck-Brouwer, E.R. Boersma, and M. Hadders-Algra. 2006. Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 75:135-144.
- Nagele, R.G., M.R. D'Andrea, W.J. Anderson, and H.Y. Wang. 2002. Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 110:199-211.

- Nagy, Z., M.M. Esiri, K.A. Jobst, J.H. Morris, E.M. King, B. McDonald, S. Litchfield, A. Smith, L. Barnettson, and A.D. Smith. 1995. Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria. *Dementia*. 6:21-31.
- Neve, R.L., E.A. Finch, and L.R. Dawes. 1988. Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain. *Neuron*. 1:669-677.
- Nikolaev, A., T. McLaughlin, D.D. O'Leary, and M. Tessier-Lavigne. 2009. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*. 457:981-989.
- Nimmrich, V., C. Grimm, A. Draguhn, S. Barghorn, A. Lehmann, H. Schoemaker, H. Hillen, G. Gross, U. Ebert, and C. Bruehl. 2008. Amyloid beta oligomers (A beta(1-42) globulomer) suppress spontaneous synaptic activity by inhibition of P/Q-type calcium currents. *J Neurosci*. 28:788-797.
- Ninomiya, H., J.M. Roch, M.P. Sundsmo, D.A. Otero, and T. Saitoh. 1993. Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J Cell Biol*. 121:879-886.
- Nishimoto, I., T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Takahashi, T. Okamoto, Y. Murayama, and E. Ogata. 1993. Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature*. 362:75-79.
- Nizzari, M., V. Venezia, E. Repetto, V. Caorsi, R. Magrassi, M.C. Gagliani, P. Carlo, T. Florio, G. Schettini, C. Tacchetti, T. Russo, A. Diaspro and C. Russo. 2006. Amyloid precursor protein and Presenilin 1 interact with the adaptor GRB2 and modulate ERK1,2 signaling. *J Biol Chem* 282 (18):13833-13844
- Oddo, S. 2008. The ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. 12:363-373.
- Oddo, S., L. Billings, J.P. Kesslak, D.H. Cribbs, and F.M. LaFerla. 2004. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*. 43:321-332.
- Oddo, S., A. Caccamo, B. Tseng, D. Cheng, V. Vasilevko, D.H. Cribbs, and F.M. LaFerla. 2008. Blocking Abeta42 accumulation delays the onset and progression of tau pathology via the C terminus of heat shock protein70-interacting protein: a mechanistic link between Abeta and tau pathology. *J Neurosci*. 28:12163-12175.
- Ohno, M., E.A. Sametsky, L.H. Younkin, H. Oakley, S.G. Younkin, M. Citron, R. Vassar, and J.F. Disterhoft. 2004. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 41:27-33.
- Oksman, M., H. Iivonen, E. Högges, Z. Amtul, B. Penke, I. Leenders, L. Broersen, D. Lutjohann, T. Hartmann, and H. Tanila. 2006. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of disease*. 23:563-572.
- Oster, T., and T. Pilot. 2010. Docosahexaenoic acid and synaptic protection in Alzheimer's disease mice. *Biochimica et biophysica acta*. 1801:791-798.
- Ouimet, C.C., K.D. Baerwald, S.E. Gandy, and P. Greengard. 1994. Immunocytochemical localization of amyloid precursor protein in rat brain. *J Comp Neurol*. 348:244-260.
- Paschen, W., and T. Mengesdorf. 2005. Endoplasmic reticulum stress response and neurodegeneration. *Cell Calcium*. 38:409-415.
- Pasinetti, G.M. 2001. Use of cDNA microarray in the search for molecular markers involved in the onset of Alzheimer's disease dementia. *Journal of neuroscience research*. 65:471-476.
- Perez-Cruz, C., M.W. Nolte, M.M. van Gaalen, N.R. Rustay, A. Termont, A. Tanghe, F. Kirchhoff, and U. Ebert. 2011. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 31:3926-3934.
- Perry, G., R. Friedman, G. Shaw, and V. Chau. 1987. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84:3033-3036.
- Peters, I., U. Igbavboa, T. Schutt, S. Haidari, U. Hartig, X. Rosello, S. Bottner, E. Copanaki, T. Deller, D. Kögel, W.G. Wood, W.E. Muller, and G.P. Eckert. 2009. The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production. *Biochimica et biophysica acta*. 1788:964-972.
- Phinney, A.L., M.E. Calhoun, D.P. Wolfer, H.P. Lipp, H. Zheng, and M. Jucker. 1999. No hippocampal neuron or synaptic bouton loss in learning-impaired aged beta-amyloid precursor protein-null mice. *Neuroscience*. 90:1207-1216.
- Pigino, G., G. Morfini, Y. Atagi, A. Deshpande, C. Yu, L. Jungbauer, M. LaDu, J. Busciglio, and S. Brady. 2009. Disruption of fast axonal transport is a pathogenic mechanism for intraneuronal

- amyloid beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:5907-5912.
- Pigino, G., G. Morfini, A. Pelsman, M.P. Mattson, S.T. Brady, and J. Busciglio. 2003. Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J Neurosci*. 23:4499-4508.
- Postina, R. 2008. A closer look at alpha-secretase. *Curr Alzheimer Res*. 5:179-186.
- Postina, R., A. Schroeder, I. Dewachter, J. Bohl, U. Schmitt, E. Kojro, C. Prinzen, K. Endres, C. Hiemke, M. Blessing, P. Flamez, A. Dequenue, E. Godaux, F. van Leuven, and F. Fahrenholz. 2004. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 113:1456-1464.
- Prehn, J.H., M. Welsch, C. Backhauss, J. Nuglisch, F. Ausmeier, C. Karkoutly, and J. Kriegstein. 1993. Effects of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia. *Brain research*. 630:10-20.
- Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H.A. Kretschmar, and J. Herms. 2006. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*. 26:7212-7221.
- Querfurth, H.W., E.M. Wijsman, P.H. St George-Hyslop, and D.J. Selkoe. 1995. Beta APP mRNA transcription is increased in cultured fibroblasts from the familial Alzheimer's disease-1 family. *Brain research*. 28:319-337.
- Refolo L.M., M.A. Papolla, B. Malester, J. LaFrancois, T. Bryant-Thomas, R. Wang, G.S. Tint, K. Sambamurti, and K. Duff. 2000. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis*. 7:321-331.
- Reinhard, C., S.S. Hebert, and B. De Strooper. 2005. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *The EMBO journal*. 24:3996-4006.
- Ring, S., S.W. Weyer, S.B. Kilian, E. Waldron, C.U. Pietrzik, M.A. Filippov, J. Herms, C. Buchholz, C.B. Eckman, M. Korte, D.P. Wolfer, and U.C. Muller. 2007. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*. 27:7817-7826.
- Robson, L.G., S. Dyall, D. Sidloff, and A.T. Michael-Titus. 2010. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase the neurite outgrowth of rat sensory neurones throughout development and in aged animals. *Neurobiol Aging*. 31:678-687.
- Roch, J.M., E. Masliah, A.C. Roch-Levecq, M.P. Sundsmo, D.A. Otero, I. Veinbergs, and T. Saitoh. 1994. Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:7450-7454.
- Rohn, T.T., K.J. Ivins, B.A. Bahr, C.W. Cotman, and D.H. Cribbs. 2000. A monoclonal antibody to amyloid precursor protein induces neuronal apoptosis. *J Neurochem*. 74:2331-2342.
- Rossjohn, J., R. Cappai, S.C. Feil, A. Henry, W.J. McKinstry, D. Galatis, L. Hesse, G. Multhaup, K. Beyreuther, C.L. Masters, and M.W. Parker. 1999. Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol*. 6:327-331.
- Roth, K.A. 2001. Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 60:829-838.
- Rotstein, N.P., L.E. Politi, O.L. German, and R. Girotti. 2003. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44:2252-2259.
- Rovelet-Lecrux, A., D. Hannequin, G. Raux, N. Le Meur, A. Laquerriere, A. Vital, C. Dumanchin, S. Feuillette, A. Brice, M. Vercelletto, F. Dubas, T. Frebourg, and D. Campion. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 38:24-26.
- Sagara, Y., and G. Inesi. 1991. Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J Biol Chem*. 266:13503-13506.
- Sahlin, C., F.E. Pettersson, L.N. Nilsson, L. Lannfelt, and A.S. Johansson. 2007. Docosahexaenoic acid stimulates non-amyloidogenic APP processing resulting in reduced A β levels in cellular models of Alzheimer's disease. *The European journal of neuroscience*. 26:882-889.
- Saitoh, T., M. Sundsmo, J.M. Roch, N. Kimura, G. Cole, D. Schubert, T. Oltersdorf, and D.B. Schenk. 1989. Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell*. 58:615-622.
- Sakamoto, T., M. Cansev, and R.J. Wurtman. 2007. Oral supplementation with docosahexaenoic acid and uridine-5'-monophosphate increases dendritic spine density in adult gerbil hippocampus. *Brain research*. 1182:50-59.

- Salehi, A., J.D. Delcroix, P.V. Belichenko, K. Zhan, C. Wu, J.S. Valletta, R. Takimoto-Kimura, A.M. Kleschevnikov, K. Sambamurti, P.P. Chung, W. Xia, A. Villar, W.A. Campbell, L.S. Kulnane, R.A. Nixon, B.T. Lamb, C.J. Epstein, G.B. Stokin, L.S. Goldstein, and W.C. Mobley. 2006. Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron*. 51:29-42.
- Sandbrink, R., C.L. Masters, and K. Beyreuther. 1994. APP gene family: unique age-associated changes in splicing of Alzheimer's betaA4-amyloid protein precursor. *Neurobiology of disease*. 1:13-24.
- Sastre, M., H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M.M. Condron, D.B. Teplow, and C. Haass. 2001. Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO reports*. 2:835-841.
- Satpute-Krishnan, P., J.A. DeGiorgis, and E.L. Bearer. 2003. Fast anterograde transport of herpes simplex virus: role for the amyloid precursor protein of alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2:305-318.
- Satpute-Krishnan, P., J.A. DeGiorgis, M.P. Conley, M. Jang, and E.L. Bearer. 2006. A peptide zipcode sufficient for anterograde transport within amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:16532-16537.
- Saunders, A.M., W.J. Strittmatter, D. Schmechel, P.H. George-Hyslop, M.A. Pericak-Vance, S.H. Joo, B.L. Rosi, J.F. Gusella, D.R. Crapper-MacLachlan, M.J. Alberts, and et al. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*. 43:1467-1472.
- Scheff, S.W., D.A. Price, F.A. Schmitt, S.T. DeKosky, and E.J. Mufson. 2007. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*. 68:1501-1508.
- Scheinfeld, M.H., R. Roncarati, P. Vito, P.A. Lopez, M. Abdallah, and L. D'Adamio. 2002. Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) binds the cytoplasmic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem*. 277:3767-3775.
- Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, and S. Younkin. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2:864-870.
- Schmechel, A., M. Strauss, A. Schlicsupp, R. Pipkorn, C. Haass, T.A. Bayer, and G. Multhaup. 2004. Human BACE forms dimers and colocalizes with APP. *J Biol Chem*. 279:39710-39717.
- Schubert, D., and C. Behl. 1993. The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from beta-amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix. *Brain research*. 629:275-282.
- Schubert, D., L.W. Jin, T. Saitoh, and G. Cole. 1989. The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron*. 3:689-694.
- Schulte-Herbruggen, O., M.C. Jockers-Scherubl, and R. Hellweg. 2008. Neurotrophins: from pathophysiology to treatment in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 5:38-44.
- Schwarzman, A.L., L. Gregori, M.P. Vitek, S. Lyubski, W.J. Strittmatter, J.J. Enghilde, R. Bhasin, J. Silverman, K.H. Weisgraber, P.K. Coyle, and et al. 1994. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:8368-8372.
- Selkoe, D., and R. Kopan. 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci*. 26:565-597.
- Selkoe, D.J. 1994. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol*. 10:373-403.
- Selkoe, D.J. 1999. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*. 399:A23-31.
- Selkoe, D.J. 2001a. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*. 81:741-766.
- Selkoe, D.J. 2001b. Presenilin, Notch, and the genesis and treatment of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:11039-11041.
- Selkoe, D.J., M.B. Podlisny, C.L. Joachim, E.A. Vickers, G. Lee, L.C. Fritz, and T. Oltersdorf. 1988. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85:7341-7345.

- Selkoe, D.J., T. Yamazaki, M. Citron, M.B. Podlisny, E.H. Koo, D.B. Teplow, and C. Haass. 1996. The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 777:57-64.
- Selznick, L.A., D.M. Holtzman, B.H. Han, M. Gokden, A.N. Srinivasan, E.M. Johnson, Jr., and K.A. Roth. 1999. In situ immunodetection of neuronal caspase-3 activation in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 58:1020-1026.
- Sengpiel, B., E. Preis, J. Kriegstein, and J.H. Prehn. 1998. NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria. *The European journal of neuroscience*. 10:1903-1910.
- Seubert, P., T. Oltersdorf, M.G. Lee, R. Barbour, C. Blomquist, D.L. Davis, K. Bryant, L.C. Fritz, D. Galasko, L.J. Thal, and et al. 1993. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide. *Nature*. 361:260-263.
- Shankar, G.M., B.L. Bloodgood, M. Townsend, D.M. Walsh, D.J. Selkoe, and B.L. Sabatini. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*. 27:2866-2875.
- Shoji, M., T.E. Golde, J. Ghiso, T.T. Cheung, S. Estus, L.M. Shaffer, X.D. Cai, D.M. McKay, R. Tintner, B. Frangione, and et al. 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*. 258:126-129.
- Shoji, M., N. Iwakami, S. Takeuchi, M. Waragai, M. Suzuki, I. Kanazawa, C.F. Lippa, S. Ono, and H. Okazawa. 2000. JNK activation is associated with intracellular beta-amyloid accumulation. *Brain research*. 85:221-233.
- Simons M., P. Keller, B. DeStrooper, K. Beyreuther, C.G. Dotti and K. Simons. 1998. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:6460-6464
- Singer, O., R.A. Marr, E. Rockenstein, L. Crews, N.G. Coufal, F.H. Gage, I.M. Verma, and E. Masliah. 2005. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci*. 8:1343-1349.
- Sisodia, S.S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:6075-6079.
- Sisodia, S.S. 2002. Biomedicine. A cargo receptor mystery APParently solved? *Science*. 295:805-807.
- Sivananthan, S.N., A.W. Lee, C.G. Goodyer, and A.C. LeBlanc. 2010. Familial amyloid precursor protein mutants cause caspase-6-dependent but amyloid beta-peptide-independent neuronal degeneration in primary human neuron cultures. *Cell Death Dis*. 1:e100.
- Skovronsky, D.M., D.B. Moore, M.E. Milla, R.W. Doms, and V.M. Lee. 2000. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem*. 275:2568-2575.
- Slater, T.F. 1963. Studies on a Succinate-Neotetrazolium Reductase System of Rat Liver. II. Points of Coupling with the Respiratory Chain. *Biochimica et biophysica acta*. 77:365-382.
- Sleegers, K., N. Brouwers, I. Gijselink, J. Theuns, D. Goossens, J. Wauters, J. Del-Favero, M. Cruts, C.M. van Duijn, and C. Van Broeckhoven. 2006. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*. 129:2977-2983.
- Sluss, H.K., T. Barrett, B. Derijard, and R.J. Davis. 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Molecular and cellular biology*. 14:8376-8384.
- Small, D.H., H.L. Clarris, T.G. Williamson, G. Reed, B. Key, S.S. Mok, K. Beyreuther, C.L. Masters, and V. Nurcombe. 1999. Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 1:275-285.
- Small, D.H., V. Nurcombe, G. Reed, H. Clarris, R. Moir, K. Beyreuther, and C.L. Masters. 1994. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci*. 14:2117-2127.
- Soba, P., S. Eggert, K. Wagner, H. Zentgraf, K. Siehl, S. Kreger, A. Lower, A. Langer, G. Merdes, R. Paro, C.L. Masters, U. Muller, S. Kins, and K. Beyreuther. 2005. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *The EMBO journal*. 24:3624-3634.
- Song, S., and Y.K. Jung. 2004. Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system. *Trends Mol Med*. 10:565-570.
- Song, S., S.Y. Kim, Y.M. Hong, D.G. Jo, J.Y. Lee, S.M. Shim, C.W. Chung, S.J. Seo, Y.J. Yoo, J.Y. Koh, M.C. Lee, A.J. Yates, H. Ichijo, and Y.K. Jung. 2003. Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity. *Mol Cell*. 12:553-563.

- Stebbins, J.L., S.K. De, T. Machleidt, B. Becattini, J. Vazquez, C. Kuntzen, L.H. Chen, J.F. Cellitti, M. Riel-Mehan, A. Emdadi, G. Solinas, M. Karin, and M. Pellecchia. 2008. Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:16809-16813.
- Stein, T.D., N.J. Anders, C. DeCarli, S.L. Chan, M.P. Mattson, and J.A. Johnson. 2004. Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis. *J Neurosci*. 24:7707-7717.
- Steinbach, J.P., U. Muller, M. Leist, Z.W. Li, P. Nicotera, and A. Aguzzi. 1998. Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice. *Cell death and differentiation*. 5:858-866.
- Stoppini, L., P.A. Buchs, and D. Muller. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*. 37:173-182.
- Su, H.M. 2010. Mechanisms of n-3 fatty acid-mediated development and maintenance of learning memory performance. *J Nutr Biochem*. 21:364-373.
- Su, J.H., A.J. Anderson, B.J. Cummings, and C.W. Cotman. 1994. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 5:2529-2533.
- Suzuki, N., T.T. Cheung, X.D. Cai, A. Odaka, L. Otvos, Jr., C. Eckman, T.E. Golde, and S.G. Younkin. 1994. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 264:1336-1340.
- Takemura, H., A.R. Hughes, O. Thastrup, and J.W. Putney, Jr. 1989. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem*. 264:12266-12271.
- Tanghe, A., A. Termont, P. Merchiers, S. Schilling, H.U. Demuth, L. Scrocchi, F. Van Leuven, G. Griffioen, and T. Van Dooren. 2010. Pathological Hallmarks, Clinical Parallels, and Value for Drug Testing in Alzheimer's Disease of the APP[V717I] London Transgenic Mouse Model. *Int J Alzheimers Dis*. 2010.
- Tanzi, R.E., J.F. Gusella, P.C. Watkins, G.A. Bruns, P. St George-Hyslop, M.L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D.M. Kurnit, and R.L. Neve. 1987. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*. 235:880-884.
- Taru, H., Y. Kirino, and T. Suzuki. 2002. Differential roles of JIP scaffold proteins in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *J Biol Chem*. 277:27567-27574.
- Taru, H., and T. Suzuki. 2004. Facilitation of stress-induced phosphorylation of beta-amyloid precursor protein family members by X11-like/Mint2 protein. *J Biol Chem*. 279:21628-21636.
- Terry, R.D., A. Peck, R. DeTeresa, R. Schechter, and D.S. Horoupian. 1981. Some morphometric aspects of the brain in senile dementia of the Alzheimer type. *Annals of neurology*. 10:184-192.
- Thastrup, O., A.P. Dawson, O. Scharff, B. Foder, P.J. Cullen, B.K. Drobak, P.J. Bjerrum, S.B. Christensen, and M.R. Hanley. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*. 27:17-23.
- Theuns, J., J. Del-Favero, B. Deraut, C.M. van Duijn, H. Backhovens, M.V. Van den Broeck, S. Serneels, E. Corsmit, C.V. Van Broeckhoven, and M. Cruts. 2000. Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression. *Hum Mol Genet*. 9:325-331.
- Theuns, J., E. Marjaux, M. Vandenbulcke, K. Van Laere, S. Kumar-Singh, G. Bormans, N. Brouwers, M. Van den Broeck, K. Vennekens, E. Corsmit, M. Cruts, B. De Strooper, C. Van Broeckhoven, and R. Vandenberghe. 2006. Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Hum Mutat*. 27:888-896.
- Thoenen, H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 270:593-598.
- Thornton, E., R. Vink, P.C. Blumbergs, and C. Van Den Heuvel. 2006. Soluble amyloid precursor protein alpha reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. *Brain research*. 1094:38-46.
- Toescu, E.C., A. Verkhratsky, and P.W. Landfield. 2004. Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci*. 27:614-620.
- Trapp, B.D., and P.E. Hauer. 1994. Amyloid precursor protein is enriched in radial glia: implications for neuronal development. *Journal of neuroscience research*. 37:538-550.
- Treen, M., R.D. Uauy, D.M. Jameson, V.L. Thomas, and D.R. Hoffman. 1992. Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function in intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*. 294:564-570.

- Tropea, D., G. Kreiman, A. Lyckman, S. Mukherjee, H. Yu, S. Horng, and M. Sur. 2006. Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat Neurosci.* 9:660-668.
- Tseng, B.P., K.N. Green, J.L. Chan, M. Blurton-Jones, and F.M. LaFerla. 2008. Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. *Neurobiol Aging.* 29:1607-1618.
- Tsuzuki, K., R. Fukatsu, H. Yamaguchi, M. Tateno, K. Imai, N. Fujii, and T. Yamauchi. 2000. Transthyretin binds amyloid beta peptides, Abeta1-42 and Abeta1-40 to form complex in the autopsied human kidney - possible role of transthyretin for abeta sequestration. *Neuroscience letters.* 281:171-174.
- Turner, P.R., K. O'Connor, W.P. Tate, and W.C. Abraham. 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in neurobiology.* 70:1-32.
- Uauy, R., and A.D. Dangour. 2006. Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr Rev.* 64:S24-33; discussion S72-91.
- Ulery, P.G., J. Beers, I. Mikhailenko, R.E. Tanzi, G.W. Rebeck, B.T. Hyman, and D.K. Strickland. 2000. Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 275:7410-7415.
- Van Broeckhoven, C. 2010. The future of genetic research on neurodegeneration. *Nat Med.* 16:1215-1217.
- van Leeuwen, F.W., D.P. de Kleijn, H.H. van den Hurk, A. Neubauer, M.A. Sonnemans, J.A. Sluijs, S. Koycu, R.D. Ramdjielal, A. Salehi, G.J. Martens, F.G. Grosveld, J. Peter, H. Burbach, and E.M. Hol. 1998. Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science.* 279:242-247.
- Vassar, R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, and M. Citron. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 286:735-741.
- Venkataram S., W.M. Awni, K. Jordan and Rahman Y.E. 1990. Pharmacokinetics of two alternative dosage forms for cyclosporine: liposomes and intralipid. *J. Pharm Sci.* 9:216-219
- Vercesi, A.E., S.N. Moreno, C.F. Bernardes, A.R. Meinicke, E.C. Fernandes, and R. Docampo. 1993. Thapsigargin causes Ca²⁺ release and collapse of the membrane potential of Trypanosoma brucei mitochondria in situ and of isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem.* 268:8564-8568.
- Vistica, D.T., P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks, A. Pittman, and M.R. Boyd. 1991. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 51:2515-2520.
- Vlahos, C.J., W.F. Matter, K.Y. Hui, and R.F. Brown. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 269:5241-5248.
- von Koch, C.S., H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L.H. van der Ploeg, D.L. Price, and S.S. Sisodia. 1997. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging.* 18:661-669.
- Wakutani, Y., K. Watanabe, Y. Adachi, K. Wada-Isoe, K. Urakami, H. Ninomiya, T.C. Saido, T. Hashimoto, T. Iwatsubo, and K. Nakashima. 2004. Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75:1039-1042.
- Walsh, D.M., I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. 2002a. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 416:535-539.
- Walsh, D.M., I. Klyubin, J.V. Fadeeva, M.J. Rowan, and D.J. Selkoe. 2002b. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochemical Society transactions.* 30:552-557.
- Wang, J.Z., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 2007. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *The European journal of neuroscience.* 25:59-68.
- Wang, P., G. Yang, D.R. Mosier, P. Chang, T. Zaidi, Y.D. Gong, N.M. Zhao, B. Dominguez, K.F. Lee, W.B. Gan, and H. Zheng. 2005. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci.* 25:1219-1225.

- Wang, P.Y., J.J. Chen, and H.M. Su. 2009. Docosahexaenoic acid supplementation of primary rat hippocampal neurons attenuates the neurotoxicity induced by aggregated amyloid beta protein(42) and up-regulates cytoskeletal protein expression. *J Nutr Biochem.* 21:345-350.
- Wang, X., X. Zhao, Z.Y. Mao, X.M. Wang, and Z.L. Liu. 2003. Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid on glutamate-induced cytotoxicity in rat hippocampal cultures. *Neuroreport.* 14:2457-2461.
- Wang, Y., and Y. Ha. 2004. The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell.* 15:343-353.
- Wehner S., C. Siemes, G. Kirfel and V. Herzog. 2004. Cytoprotective function of sAPPalpha in human keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* 83:701-708
- Wei, W., D.D. Norton, X. Wang, and J.W. Kusiak. 2002a. Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain.* 125:2036-2043.
- Wei, W., X. Wang, and J.W. Kusiak. 2002b. Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection. *J Biol Chem.* 277:17649-17656.
- Weidemann, A., G. König, D. Bunke, P. Fischer, J.M. Salbaum, C.L. Masters, and K. Beyreuther. 1989. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell.* 57:115-126.
- Wertkin, A.M., R.S. Turner, S.J. Pleasure, T.E. Golde, S.G. Younkin, J.Q. Trojanowski, and V.M. Lee. 1993. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90:9513-9517.
- Westmeyer, G.G., M. Willem, S.F. Lichtenthaler, G. Lurman, G. Multhaup, I. Assfalg-Machleidt, K. Reiss, P. Saftig, and C. Haass. 2004. Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem.* 279:53205-53212.
- Westwick, J.K., C. Weitzel, A. Minden, M. Karin, and D.A. Brenner. 1994. Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J Biol Chem.* 269:26396-26401.
- Wolfe, M.S. 2007. gamma-Secretase modulators. *Curr Alzheimer Res.* 4:571-573.
- Wurtman, R.J., M. Cansev, T. Sakamoto, and I.H. Ulus. 2009. Administration of docosahexaenoic acid, uridine and choline increases levels of synaptic membranes and dendritic spines in rodent brain. *World Rev Nutr Diet.* 99:71-96.
- Xu Y., K.K. Kinningham, M.N. Devalaraja, C.C. Yeh, H. Majima, E.J. Kasarskis and D.K. St Clair. 1999. An intronic NF-kappaB element is essential for induction of the human manganese superoxide dismutase gene by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta DNA. *Cell Biol.* 18:709-722.
- Yang, G., Y.D. Gong, K. Gong, W.L. Jiang, E. Kwon, P. Wang, H. Zheng, X.F. Zhang, W.B. Gan, and N.M. Zhao. 2005. Reduced synaptic vesicle density and active zone size in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *Neuroscience letters.* 384:66-71.
- Yang, X., S. Askarova, and J.C. Lee. 2010. Membrane biophysics and mechanics in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 41:138-148.
- Yankner, B.A. 1996. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron.* 16:921-932.
- Yehuda, S., S. Rabinovitz, and D.I. Mostofsky. 1999. Essential fatty acids are mediators of brain biochemistry and cognitive functions. *Journal of neuroscience research.* 56:565-570.
- Yoshikai, S., H. Sasaki, K. Doh-ura, H. Furuya, and Y. Sakaki. 1990. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene.* 87:257-263.
- Young-Pearse, T.L., A.C. Chen, R. Chang, C. Marquez, and D.J. Selkoe. 2008. Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. *Neural development.* 3:15.
- Yurko-Mauro, K., D. McCarthy, D. Rom, E.B. Nelson, A.S. Ryan, A. Blackwell, N. Salem, Jr., and M. Stedman. 2010. Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement.* 6:456-464.
- Zambrano, N., G. Minopoli, P. de Candia, and T. Russo. 1998. The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1. *J Biol Chem.* 273:20128-20133.
- Zhao, Y., F. Calon, C. Julien, J.W. Winkler, N.A. Petasis, W.J. Lukiw, and N.G. Bazan. 2011. Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPARgamma-mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS One.* 6:e15816.

- Zheng, H., M. Jiang, M.E. Trumbauer, D.J. Sirinathsinghji, R. Hopkins, D.W. Smith, R.P. Heavens, G.R. Dawson, S. Boyce, M.W. Conner, K.A. Stevens, H.H. Slunt, S.S. Sisoda, H.Y. Chen, and L.H. Van der Ploeg. 1995. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*. 81:525-531.
- Zheng, H., and E.H. Koo. 2011. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener*. 6:27.
- Zhu, X., A.K. Raina, C.A. Rottkamp, G. Aliev, G. Perry, H. Bux, and M.A. Smith. 2001. Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 76:435-441.
- Zhu, X., B. Su, X. Wang, M.A. Smith, and G. Perry. 2007. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci*. 64:2202-2210.
- Zhu, Y.J., H. Lin, and R. Lal. 2000. Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J*. 14:1244-1254.
- Zinck, R., M.A. Cahill, M. Kracht, C. Sachsenmaier, R.A. Hipskind, and A. Nordheim. 1995. Protein synthesis inhibitors reveal differential regulation of mitogen-activated protein kinase and stress-activated protein kinase pathways that converge on Elk-1. *Molecular and cellular biology*. 15:4930-4938.

9 ANHANG

9.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	
A.E.	A rbiträre E inheiten
AD	A lzheimer's D isease
ADAM9/10/17	A Disintegrin A nd M etalloprotease 9/10/17
AICD	A PP intracellular C -terminal D omain
Akt	Protein kinase B (Akt1)
AMC	A minomethylcoumarin
AP-1	A ctivator protein 1
APH-1	A nterior P harynx Defective 1
APLP1/2	A PP Like Protein 1/2
ApoE	A polipoprotein E
APP	A myloid P recursor Protein
APS	A mmoniumperoxidsulfat
ATF2	A ctivating T ranscription F actor 2
ATP	A denosin t riphosphat
A β	A myloid β
B	
BACE1/2	β -site A PP-Cleaving E nzyme 1/2
BAD	B cl-2-associated death promoter
BCA	B icinchoninic A cid (Bicinchoninsäure)
Bcl-2	B -cell lymphoma 2
BHT	B utylhydroxytoluol
BMGY	B uffered M edia containing G lycerol and Y east nitrogen
BMMY	B uffered M edia containing M ethanol and Y east nitrogen
BSA	B ovines S erum A lbumin
C	
C83	C -terminales Fragment 83
C99	C -terminales Fragment 99
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CAF	C ytosine β -D- A rabinofuranosidase
CAPPD	C entral A PP D omain
CBF1	Protein C binding factor 1
cDNA	copy D N A
cGMP	cyclic G uanosine- M onophosphate
CHT	C holin T ransporter
COS7	CV -1 (simian) in O origin, and carrying the SV 40 promotor
CRMP-2	C ollapsin R esponse M ediator P rotein- 2
CTF99	C - T erminales F ragment 99
CuBD	Copper (Kupfer = Cu) B inding D omain
D	
DA	D ocosanoic A cid (Docosansäure)

Da	Dalton
DHA	Docosa hexaenoic Acid (Docosahexaensäure)
DMEM	Dul becco's Mod ified Eagle Med ium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribo nucleic Acid
DR6	Death Rezeptor-6
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
E	
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELK1	Ets LiKe gene 1
EO FAD	Early Onset of Familial Alzheimer`s Disease
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
EtOH	Ethanol
F	
FAD	Familial Alzheimer`s Disease
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
G	
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFLD	Growth Factor Like Domain
GFP	Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes
GRB2	Growth factor Receptor-bound protein 2
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
H	
HBS	HEPES Buffered Saline Solution
HCl	Wasserstoffchlorid
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293
HS	Horse Serum (Pferdeserum)
I	
IGF1/2	Insulin-like growth factor 1/2
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 Receptor
IR	Insulin Receptor
J	
JIP1	JNK interacting protein 1
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K	
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo Dalton
KLC	Kinesin Light Chain (leichte Ketten von Kinesin)
KPI	Kunitz Protease Inhibitor
L	
LO AD	Late Onset of Alzheimer`s Disease
LRP	Low density Lipoprotein receptor-related Protein
LS	Lipoid@S100 (Leerliposomen)
LTP	Long Term Potentiation (Langzeitpotenzierung)
M	

MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
MLK3	Mixed Lineage Kinase 3
MLV	Multilammellar Vesticles
mM	millimolar
MnSOD	Mangan Superoxid-Dismutase
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid
N	
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
N-APP	N-terminales Fragment von sAPPβ
NFT	Neurofibrillary Tangles (neurofibrilläre Bündel)
NF- κ B	Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B
NGF	Nerve Growth Factor (Nerven Wachstumsfaktor)
NGFR	Nerve Growth FactorReceptor
NICD	Notch Intracellular Domain
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPD1	Neuroprotectin D1
O	
OD	Optische Dichte
P	
PAA	Polyacrylamid (Acrylamide-Bis Lösung (37,5:1) 40%)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC12	Pheochromocytoma 12
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEN-2	Presenilin-Enhancer-2
PFA	Paraformaldehyd
PHF	PairedHelicalFilament (paarige helikale Filamente)
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PQC	Protein Quality Control (Proteinqualitätskontrolle)
PSEN1/2	Presenilin1/2
Q	
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
R	
RNA	Ribonucleic Acid

ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S	
sAPP α	soluble/secreted APP \square
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean
STS	Staurosporin
SUV	Small Unilammelar Vesicles
T	
TACE	Tumor necrosis factor α -Converting Enzyme
TBP	Tata-Box Binding Protein
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TMB	Tetra-Methyl-Benzidin
TNF α	Tumor Necrosis Factor- α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTR	Transthyretin
U	
UBB	Ubiquitin-B
UCH-L1	Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase isozyme L1
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin Proteasom System
UV	Ultraviolette Licht
V	
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
W	
WEP	Westernelektrophoresepuffer
wt	wild type
Y	
YNB	Yeast Nitrogen Base
Z	
ZFE	Zentrale Forschungs-Einrichtung
ZNS	Zentrales Nervensystem

9.2 TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 3.1: ZELLKULTURMATERIAL	26
TABELLE 3.2: MOLEKULARBIOLOGISCHE SUBSTANZEN	27
TABELLE 3.3: ANTIKÖRPER	28
TABELLE 3.4: VERWENDETE KITS	29
TABELLE 3.5: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE ENZYME, INHIBITOREN UND PHARMAKA	29
TABELLE 3.6: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE LABORGERÄTE	30
TABELLE 3.7: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE SOFTWARE	31
TABELLE 4.1: ZUSAMMENSETZUNG MEM II.....	35
TABELLE 4.2: ZUSAMMENSETZUNG DES HBS-PUFFERS.....	37
TABELLE 4.3: FÜR CASPASE-ASSAY VERWENDETE LÖSUNGEN.	39
TABELLE 4.4: ZUSAMMENSETZUNG DES FIXATIVS.	41
TABELLE 4.5: ZUSAMMENSETZUNG DES 2X-SDS-LYSEPUFFERS.	41
TABELLE 4.6: ZUSAMMENSETZUNG 6X-LADEPUFFER.	43
TABELLE 4.7: ZUSAMMENSETZUNG VON SAMMEL- UND TRENNUNG.	43
TABELLE 4.8: ZUSAMMENSETZUNG DES WEP.....	44
TABELLE 4.9: ZUSAMMENSETZUNG DES TRANSFERPUFFERS.....	44
TABELLE 4.10: ZUSAMMENSETZUNG TBS-T _{0,05%}	45
TABELLE 4.11: ZUSAMMENSETZUNG DER LIPOSOMENLÖSUNG.....	50
TABELLE 4.12: ZUSAMMENSETZUNG VON BMGY UND BMMY.....	53
TABELLE 4.13: ZUSAMMENSETZUNG DES LEW-PUFFERS.	53
TABELLE 4.14: ZUSAMMENSETZUNG DES ÄQUILIBRIERUNGSPUFFERS.....	53

9.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1-1: AMYLOID PLAQUES UND NEUROFIBRILLÄRE BÜNDEL.	2
ABBILDUNG 1-2: GENETISCHE RISIKOFAKTOREN DER ALZHEIMER KRANKHEIT.	10
ABBILDUNG 1-3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PROTEOLYTISCHEN SPALTUNG VON APP.	13
ABBILDUNG 1-4: TOPOLOGIE DER DOMÄNENSTRUKTUR VON APP695.	19
ABBILDUNG 4-1: PRINZIP DER TAQMAN-PCR.	47
ABBILDUNG 4-2: REDUKTION VON MTT ZU FORMAZAN.	48
ABBILDUNG 4-3: VEKTORKARTE VON PBLHIS-SX-SAPP695 α	51
ABBILDUNG 5-1: APP EXPRESSION IN APP-ÜBEREXPRIMIERENDEN HEK ZELLEN.	56
ABBILDUNG 5-2: STRUKTURFORMEL DES PROTEASOM-INHIBITOR EPOXOMICIN.	57
ABBILDUNG 5-3: SAPP SCHÜTZT PC12 ZELLEN VOR ZELLTOD INDUZIERT DURCH PROTEASOMALEN STRESS.	58
ABBILDUNG 5-4: SAPP SCHÜTZT PC12 ZELLEN VOR CASPASE-ABHÄNGIGER APOPTOSE INDUZIERT DURCH PROTEASOMALEN STRESS.	59
ABBILDUNG 5-5: SAPP α UND NICHT SAPP β SCHÜTZT DOSISABHÄNGIG VOR PROTEASOMALEM STRESS.	60
ABBILDUNG 5-6: SAPP INHIBIERT DEN JNK/C-JUN SIGNALWEG.	62
ABBILDUNG 5-7: SAPP AKTIVIERT DEN ANTI-APOPTOTISCHEN PI3K/AKT SIGNALWEG.	64
ABBILDUNG 5-8: STRUKTURFORMELN VON (A) DOCOSANSÄURE (DA) UND (B) DOCOSAHEXAENSÄURE (DHA).	66
ABBILDUNG 5-9: ETABLIERUNG DER DOSIS UND DER BEHANDLUNGSDAUER FÜR THAPSIGARGIN UND STAUROSPORIN.	68
ABBILDUNG 5-10: AUFNAHME VON DHA UND DEREN EINFLUSS AUF DIE MEMBRANFLUIDITÄT.	69
ABBILDUNG 5-11: NACHWEIS VON SAPP α UND CTF99 NACH LANGZEITINKUBATION MIT LIPOSOMEN.	70
ABBILDUNG 5-12: DHA VERMITTELTE PROTEKTION VOR THAPSIGARGIN-INDUZIERTER APOPTOSE.	72
ABBILDUNG 5-13: DIE PROTEKTION VON DHA WIRD DURCH SAPP α VERMITTELT.	73
ABBILDUNG 5-14: KINETIK DER THAPSIGARGIN-INDUZIERTEN CASPASE-ABHÄNGIGEN APOPTOSE IN PC12 ZELLEN.	75
ABBILDUNG 5-15: SAPP SCHÜTZT PC12 ZELLEN VOR APOPTOSE INDUZIERT DURCH Ca ²⁺ -FREISETZUNG.	76
ABBILDUNG 5-16: EINFLUSS DES PI3K/AKT INHIBITORS LY294002 AUF DIE SAPP α -VERMITTELTE PROTEKTION NACH Ca ²⁺ -FREISETZUNG DURCH THAPSIGARGIN.	77
ABBILDUNG 5-17: ÜBERSTÄNDE VON HEK-APP ZELLEN REDUZIEREN DIE JNK-AKTIVIERUNG NACH Ca ²⁺ -FREISETZUNG INDUZIERT DURCH THAPSIGARGIN.	78
ABBILDUNG 5-18: FC-SAPP SCHÜTZT DOSISABHÄNGIG VOR Ca ²⁺ -FREISETZUNG AUSGELOST DURCH THAPSIGARGIN UND VOR STAUROSPORIN-INDUZIERTER APOPTOSE.	79
ABBILDUNG 5-19: SAPP α SCHÜTZT HIPPOCAMPAL NEURONE VOR EINER NMDA-SCHÄDIGUNG.	81
ABBILDUNG 5-20: EINE KURZZEITBEHANDLUNG MIT DHA ERHÖHT DIE BASALE VIABILITÄT VON PC12 ZELLEN.	83
ABBILDUNG 5-21: EINE KURZZEITBEHANDLUNG MIT DHA SCHÜTZT PC12 ZELLEN VOR APOPTOSE.	84
ABBILDUNG 5-22: DIE KOMPLEXIERUNG VON DHA AN BSA SCHÜTZT PC12 ZELLEN VOR APOPTOSE.	85
ABBILDUNG 6-1: MÖGLICHE MECHANISMEN DER SAPP α -VERMITTELTEN PROTEKTION.	93
ABBILDUNG 6-2: EINFLUSS VON DHA AUF DIE PROZESSIERUNG VON APP.	102

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Steffi Chang

Darmstadt, den

DANKSAGUNG

Herrn PD Dr. Donat Kögel danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen, für die Überlassung des interessanten Themas, für die zahlreichen anregenden Diskussionen und Hilfestellungen, die entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Paul Layer möchte ich für die Übernahme der offiziellen Betreuung an der TU Darmstadt danken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Galuske bedanken, der sich wiederholt bereiterklärt hat als Gutachter zu wirken.

Ein herzlicher Dank geht natürlich an meine Kollegen der AG Kögel und der AG Auburger. Ihr habt für eine schöne Zeit in- und außerhalb des Labors gesorgt.

Des Weiteren möchte ich mich bei der AG Müller am Biozentrum für die freundliche Aufnahme im Labor und eine sehr gute Kooperation bedanken. Außerdem möchte ich Freddy danken, der mich in die Geheimnisse der Hefekultivierung und der Aufreinigung von Proteinen eingewiesen hat. Natürlich auch den Korrekturlesern ein Dankeschön! Übrig gebliebene Fehler widme ich Euch ;O)

Meinen Eltern und meinem Mann möchte ich auch hier nochmals danken, für Ihre Unterstützung vor Ort und am Telefon!

So long and thanks for the fish!

LEBENS LAUF

Zur Person

Name: Steffi Chang geb. Böttner
geboren am: 13.02.1981 in Meiningen
Staatsangehörigkeit: Bundesrepublik Deutschland
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

ab 09/2007 Beginn der Promotion am Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main. Anfertigung in der Abteilung „Experimentelle Neurochirurgie“ mit dem Thema: „The physiological role of APP in neuroprotection“

10/1999 - 09/2007 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt
Abschluss: Diplom (Note: „sehr gut“)

Diplomarbeit am Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main mit dem Titel: „Untersuchung zur physiologischen Rolle von PINK1 bei der Regulation neuronaler Stressantworten und der Apoptose“

08/1994 - 06/1999 Pierre-de-Coubertin-Gymnasium Spezialechule für Sport, Erfurt
Abschluss: Abitur (Note: 1,9)

Berufserfahrung

2001-2006 Harlan Laboratories Inc., Roßdorf
Analyse von Toxizitäts- und Mutagenitätsstudien

Publikationen

The APP intracellular domain (AICD) potentiates ER stress-induced apoptosis

D. Kögel, C. Concannon, T. Müller, H. König, C. Bonner, S. Poeschel, S. Chang, R. Egensperger and J. H. M. Prehn
Neurobiology of Aging (2011) (akzeptiertes Manuskript)

Liposome-incorporated DHA increases neuronal survival by enhancing non-amyloidogenic APP processing

G. Eckert*, S. Chang*, J. Eckmann, E. Copanaki, S. Hagl, U. Hener, W. Müller, D. Kögel
Biochimica et Biophysica Acta 1808 (2011) 236–243
*contributed equally to this work

sAPP α antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress

E. Copanaki, S. Chang, A. Vlachos, J. Tschäpe, U. Müller, D. Kögel, T. Deller
Molecular and Cellular Neuroscience 44 (2010) 386–393

The interaction of beta-amyloid protein with cellular membranes stimulates its own production

Peters, U. Igbavboa, T. Schütt, S. Haidari, U. Hartig, X. Rosello, S. Böttner, E. Copanaki, T. Deller, D. Kögel, W. Wood, W. Müller, G. Eckert
Biochimica et Biophysica Acta 1788 (2009) 964–972

Posterbeiträge

- | | |
|----------|---|
| 09/ 2010 | Neurowoche, Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Mannheim
„Enhanced generation of sAPP α is required for the neuroprotective effects of the omega-3 fatty acid DHA”
S. Chang, J. Eckmann, E. Copanaki ¹ , W. Müller, G. Eckert, D. Kögel |
| 03/ 2009 | 9 th International Conference AD/PD, Prag, Tschechien
„Enhanced generation of sAPP α is required for the neuroprotective effects of the omega-3 fatty acid DHA”
D. Kögel, S. Böttner, U. Hartig, E. Copanaki ¹ , W. Müller, G. Eckert |
| 03/ 2009 | ICNF-Symposium „Neuroscience in Frankfurt“, J.W. Goethe-Universität Frankfurt
„Enhanced generation of sAPP α is required for the neuroprotective effects of the omega-3 fatty acid DHA”
S. Böttner, U. Hartig, E. Copanaki ¹ , W. Müller, G. Eckert, D. Kögel |